
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GENES OF IMMUNE RESPONSE IN WATER BUFFALO (*BUBALUS BUBALIS*) AND MAJOR BUBALINE INFECTIOUS AGENTS

Flora Alfano

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XXVI ciclo
Indirizzo Biotechnologie per le produzioni vegetali
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXVI ciclo
Indirizzo Biotecnologie per le produzioni vegetali
Università di Napoli Federico II



MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GENES OF IMMUNE RESPONSE IN WATER BUFFALO (BUBALUS BUBALIS) AND MAJOR BUBALINE INFECTIOUS AGENTS

Flora Alfano

Dottoranda: Flora Alfano

Relatore: Prof. ssa Amalia Barone

Co-Relatore: Dott. Giorgio Galiero

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

INDICE

SUMMARY	pag.	1
RIASSUNTO	pag.	3
1. INTRODUCTION	pag.	11
1.1 Gastrointestinal pathogens	pag.	11
1.2 Tuberculosis and role of TLR gene in the <i>Bubalus bubalis</i> innate immunity	pag.	13
1.3 Aims	pag.	15
2. MATERIALS AND METHODS	pag.	17
2.1 Genetic characterization of bubaline gastrointestinal pathogens	pag.	17
2.1.1 2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	pag.	17
2.1.1.1 Virulotyping	pag.	17
2.1.1.2 Haemolysis test	pag.	17
2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	pag.	17
2.1.2.1 Virulotyping	pag.	18
2.1.2.2 <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i> antimicrobial resistance	pag.	18
2.2 Genetic characterization of <i>Bubalus bubalis</i> toll-like receptor genes	pag.	19
2.2.1 Study design	pag.	19
2.2.2 Sample size calculation	pag.	19
2.2.3 Protocol of sample analysis	pag.	19
2.2.4 SNP selection and genotyping	pag.	19
2.2.5 Genetic association analysis	pag.	19
3. RESULTS	pag.	21
3.1 Genetic characterization of bubaline gastrointestinal pathogens	pag.	21
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	pag.	21
3.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	pag.	21
3.2 Genetic characterization of <i>Bubalus bubalis</i> toll-like receptor genes	pag.	22
3.2.1 Identification of SNPs	pag.	22
3.2.2 Case-control study	pag.	22
4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS	pag.	25
4.1 Gastrointestinal pathogens	pag.	25
4.2 <i>Bubalus bubalis</i> toll-like receptor genes	pag.	27
5. REFERENCES	pag.	31
6. FIGURES	pag.	39
7. TABLES	pag.	47

SUMMARY

The water buffalo (*Bubalus bubalis*) is one of the most important livestock species, its economic importance is due to the production of the worldwide famous mozzarella cheese (*Mozzarella di Bufala Campana*).

Among the major pathogens with zoonotic potential affecting water buffalo species a crucial role is played by *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., responsible for gastrointestinal diseases and *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis. The prophylaxis for gastrointestinal pathogens allows the use of specific vaccines. By contrast, for *Mycobacterium bovis* the Italian National Program for the tuberculosis control and eradication, prohibits vaccination.

In this context the gastrointestinal pathogens were studied to well characterize them and allow the production of effective autogenous vaccines, while for tuberculosis a molecular characterization of host genes (*Bubalus bubalis* toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, toll-like receptor 9) has been performed. The role of genes in protection also against bacterial infections prompted the search for polymorphisms conferring resistance to mycobacterial infection in this species. The genetic selection, as a mean to increase the frequency of genes providing resistance to infection diseases, may have a positive impact on the economics of dairy industry.

In the current study were performed: (I) a molecular characterization of the virulence factors of *E. coli* and *Salmonella* spp. and (II) a molecular characterization of genes involved in the immune response of water buffalo.

Escherichia coli isolates from water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves affected by severe diarrhoea with a lethal outcome were characterized for the presence of the virulence factors LT, ST, Stx1, Stx2, haemolysins, intimin, CNF, CDT, and F17-related fimbriae. The prevalence of ETEC, STEC and NTEC were 1.8%, 6.8% and 20.9%, respectively. The ETEC isolates were all LT-positive and ST-negative. The STEC isolates were all Stx and intimin-positive, with Stx1 (80%) more frequent than Stx2 (27%). The NTEC isolates were all CNF and Hly-positive. Susceptibility assays to antimicrobials displayed high rates of resistance (>30%) to antimicrobials tested. These data show that the most prevalent strains in diarrhoeic water buffalo calves were NTEC, mostly CNF and hly positive, with strong associations CNF/CDT and CNF/F17.

Salmonellosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves is a widespread disease characterized by severe gastrointestinal lesions, profuse diarrhea and severe dehydration, occasionally exhibiting a systemic course. Several *Salmonella* serovars seem to be able to infect water buffalo, but *Salmonella* isolates collected from this animal species have been poorly characterized. In the present study, the prevalence of *Salmonella* spp. in water buffalo calves affected by lethal gastroenteritis was assessed, and a characterization of isolated strains of *S. Typhimurium* was performed.

The microbiological analysis of the intestinal contents obtained from water buffalo calves affected by lethal gastroenteritis exhibited a significant prevalence of *Salmonella* spp., characterized by different serovars, most frequently Typhimurium. The 13 *S. Typhimurium* isolates were all associated with enterocolitis characterized by severe damage of the intestine, and only sporadically isolated with another possible causative agent responsible for gastroenteritis. The *S. Typhimurium* strains were characterized by phage typing and further genotyped by polymerase chain reaction (PCR) detection of 24 virulence genes. The isolates exhibited nine different phage types and 10 different genetic profiles. These results provide evidence that

Salmonella is frequently associated with gastroenteritis in water buffalo calves, particularly *S. Typhimurium*. Moreover, the variety in the number and distribution of different virulence markers among the collected *S. Typhimurium* strains suggests that within this serovar there are different pathotypes potentially responsible for different clinical syndromes.

Toll-like receptors play a key role in innate immunity by recognizing pathogens and activating appropriate responses. Pathogens express several signal molecules (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) essential for survival and pathogenicity. Recognition of PAMPs triggers an array of anti-microbial immune responses through the induction of various inflammatory cytokines. A case-control study was performed to characterize the distribution of polymorphisms in three candidate genes (*toll-like receptor 2*, *toll-like receptor 4*, *toll-like receptor 9*) and to test their role as potential risk factors for tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*).

The case-control study included 174 subjects, 54 of which resulted positive to both intradermal TB test and *Mycobacterium bovis* isolation (cases) and 120 resulted negative to at least three consecutive intradermal TB tests. The statistical analysis indicated that six polymorphisms exhibited significant differences in allelic frequencies between cases and controls. Indeed, the GG and TT genotypes at *TLR2* 381 A>G and *TLR2* 2064 T>C sites, respectively, resulted significantly associated with susceptibility to bovine tuberculosis ($P < 0.001$, OR=52.25, 95% CI=6.75÷404.57, and $P < 0.001$, OR= 48.5, 95% CI=10.88÷216.26, respectively). Four polymorphisms resulted significantly associated with resistance to the disease, and included the AG and CC genotypes, at the *TLR2* 381 A>G and *TLR2* 2064 T>C sites, respectively, ($P < 0.001$, OR= 0.06, 95% CI= 0.01 to 0.25, and $P < 0.001$, OR=0.04, 95% CI=0.01÷0.13, respectively); the CC genotype at the *TLR4* 672 A>C site ($P = 0.01$, OR= 0.28, 95% CI=0.10÷0.76), and the C/C genotype at the *TLR9* 2340 C>T site ($P = 0.04$, OR=0.33, 95% CI=0.11÷0.92). Haplotype reconstruction of the *TLR2* gene revealed an haplotype (CTTACCAGCGGCCAGTCCC) associated with disease resistance ($P=0.04$, OR=0.51, 95% CI=0.27÷0.96), including both allelic variants associated with disease resistance.

The work describes novel mutations in bubaline *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes and presents their association with *M. bovis* infection. These results will enhance our ability to determine the risk of developing the disease by improving the knowledge of the immune mechanisms involved in host response to mycobacterial infection, and will allow the creation of multiple layers of disease resistance in herds by selective breeding.

RIASSUNTO

Il bufalo (*Bubalus bubalis*) è una delle specie economicamente più importanti per l'industria lattiero-casearia, è allevato in tutto il mondo ed in particolare nel sud dell'Italia; la sua importanza è dovuta alla produzione della mozzarella (mozzarella di bufala campana DOP).

Le zoonosi (malattie trasmissibili all'uomo) dei grandi ruminanti sono causa di notevoli perdite economiche ed inoltre rappresentano un rischio per la salute umana. Fra i principali patogeni con potenziale zoonosico che colpiscono la specie bufalina un ruolo cruciale è giocato da *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., responsabili di patologie gastrointestinali (Fagiolo et al. 2005) e *Mycobacterium bovis* responsabile della tubercolosi, attualmente considerata una patologia riemergente. Per la profilassi delle malattie dovute a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. è autorizzato l'uso di specifici vaccini, mentre per *Mycobacterium bovis* il Piano Nazionale Italiano per il controllo e l'eradicazione della tubercolosi, proibisce l'uso di vaccini. In particolare il PNI impone l'abbattimento di tutti i capi risultati positivi al test dell'intradermotubercolinizzazione (skin test), ed il prelievo dall'animale morto di un campione di linfonodo, dal quale successivamente va effettuato l'isolamento del micobatterio, come analisi di conferma (OIE, 2013). Lo skin test può dare falsi positivi, per cui fra gli animali abbattuti ve ne sono alcuni in cui non vengono mai ritrovati i tipici segni della malattia all'esame anatomopatologico e mai da essi viene isolato il micobatterio (Pollock e Neill 2002). Questo ha significative implicazioni per il controllo della malattia ed i programmi di eradicazione. Studi sia su animali malati che su animali che sono stati esposti alla malattia ma che non l'hanno sviluppata possono fornire importanti informazioni per la caratterizzazione dei geni coinvolti nell'immunità innata del bufalo.

La presenza di queste patologie infettive negli allevamenti bufalini della Campania rende il bufalo un ottimo modello animale nel quale condurre studi: a) sulla caratterizzazione dei patogeni gastrointestinali come *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., responsabili di gastroenteriti, con l'obiettivo di permettere la produzione di vaccini autogeni più efficienti e b) sulla identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti nella resistenza o suscettibilità all'infezione da micobatterio, col fine di creare nell'ambito degli allevamenti strati molteplici di resistenza.

Patogeni gastrointestinali: *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

La sintomatologia tipica delle gastroenteriti è caratterizzata da diarrea e conseguente disidratazione, che può presentarsi in forme più o meno gravi. Talvolta, al coinvolgimento del tratto gastroenterico si accompagna anche quello di altri distretti, e questo accade quando ad essere coinvolti sono batteri in grado di dare setticemia o di produrre tossine che attraverso il circolo sanguigno raggiungono diversi organi bersaglio, quali apparato respiratorio, articolazioni e sistema nervoso centrale. Inoltre i microrganismi patogeni possono agire in associazione nello stesso animale, contribuendo a rendere più complesso il quadro delle misure terapeutiche e profilattiche da intraprendere nelle aziende interessate (Fagiolo et al. 2005).

La diffusione di questi patogeni, particolarmente *E. coli* e *Salmonella* spp., negli allevamenti di ruminanti domestici rappresenta oggi un ulteriore motivo di allarme a causa della presenza e diffusione di batteri antibiotico-resistenti in risposta all'ampio e indiscriminato uso di antibiotici per il trattamento di malattie infettive nei giovani animali.

Molti dei microrganismi patogeni responsabili di gastroenterite nel vitello bufalino sono caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza, implicati nella patogenesi e nella evoluzione della sindrome gastro-enterica. In particolare, le infezioni da *E. coli* possono essere causate da diversi patotipi, principalmente *E. coli* enterotossici (ETEC), *E. coli* enteropatogeni (EPEC), ed *E. coli* produttori di tossine Shiga (STEC). Questi patotipi possono indurre una varietà di sintomi, tra cui diarrea, colite emorragica e infezioni extra-intestinali (Quinn *et al.* 2011). I loro meccanismi patogeni possono essere attribuiti a diversi fattori di virulenza quali: enterotossine (tossina termolabile – LT, simile alle tossine coleriche e in grado di fungere anche da fattore di adesione; tossina termostabile - ST, in grado di determinare squilibrio idrico agendo sull'assorbimento del Na⁺); tossine Shiga (Stx1 e Stx2), che inducono la morte cellulare inibendo la sintesi proteica; fattori di colonizzazione (flagelli, capsule, lipopolisaccaride, adesine e fimbrie – tra cui le fimbrie della famiglia F17) (Quinn *et al.* 2011). Inoltre, spesso in associazione a casi di infezioni extra-intestinali, possono essere isolati *E. coli* necrotossici (NTEC), caratterizzati dalla presenza di fattori citotossici necrotizzanti (CNF) e/o di una tossina citoletale (CDT), tutti fattori in grado di indurre morte cellulare. Alcuni o tutti questi patotipi possono esprimere ulteriori fattori di virulenza quali l'intimina, codificata dal gene *eae*, e le emolisine (*hly*), ad azione citotossica.

Salmonella dispone di specifici fattori di virulenza collocati a livello cromosomiale, sulle Isole di Patogenicità, a livello plasmidico o delle regioni profagiche, la cui presenza può determinare un incremento della virulenza, una maggior tendenza all'invasività e la resistenza verso una o più classi di antibiotici. Le SPI (Salmonella Pathogenicity Island), sono regioni di DNA dove si localizzano i geni fondamentali per la virulenza del batterio che risultano essere assenti nei ceppi non patogeni.

Lo studio delle gastroenteriti nei vitelli bufalini dovute ad *E. coli* e *Salmonella* spp. è stato condotto nella regione Campania su 248 vitelli bufalini allevati in 25 aziende diverse. Gli animali avevano un'età compresa tra 1 giorno e 4 settimane e risultavano tutti affetti da sindrome gastroenterica.

E. coli è stato isolato mediante metodo microbiologico ed è stato considerato come plausibilmente correlato alla sindrome diarroica solo quando riscontrato in concentrazioni non inferiori a 10⁸ UFC/g di contenuto intestinale (Quinn *et al.* 2011). I ceppi di *E. coli* sono stati caratterizzati per la presenza di specifici fattori di virulenza (*lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *eae*, *cnf*, *cdt*, *F17*). L'attività emolitica (*hly*) per ciascun ceppo è stata definita valutando l'alone di emolisi in seguito a crescita su agar al 5% di sangue di montone (Quinn *et al.* 2011).

L'isolamento di *Salmonella* spp. è stato effettuato secondo quanto indicato nella relativa norma ISO (UNI EN ISO 6579:2002). Le salmonelle isolate sono state sierotipizzate per l'identificazione dei ceppi di *S. enterica* sottospecie Typhimurium secondo lo schema di Kaufmann-White (Grimont *et al.* 2007). I ceppi isolati di *S. Typhimurium* sono stati fagotipizzati dal Centro di Referenza Nazionale Italiano per le Salmonellosi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie).

I ceppi di *Salmonella Typhimurium* sono stati caratterizzati attraverso l'identificazione di 24 geni codificanti per fattori di virulenza. La caratterizzazione genetica include cinque *loci* (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, and *sopB*) localizzati rispettivamente su SPI 1-5 (Huen *et al.* 2009), otto *loci* (*gipA*, *gtgB*, *sopE*, *sodC1*, *gtgE*, *gogB*, *sspH1*, and *sspH2*) di origine profasica (Mikasowa *et al.* 2005; Chiu & Ou 1996; Hopkins & Threlfall 2004), il gene *spvC*, localizzato su un plasmide di virulenza e nove geni (*stfE*, *safC*, *csgA*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, *pefA*, *fimA*, and *agfA*) codificanti per fimbrie

batteriche, coinvolte nell'adesione alle superfici e colonizzazione dell'intestino (Barrow et al. 2010).

Tutti i ceppi di *E. coli* e di *Salmonella* spp. isolati sono stati caratterizzati per la suscettibilità/resistenza agli antibiotici mediante la tecnica di diffusione di Kirby-Bauer su Mueller-Hinton Agar (Oxoid), secondo quanto indicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). I ceppi di *E. coli* sono stati saggiati per la sensibilità ai seguenti 16 antibiotici: acido nalidixico (ANA), amoxicillina (AMC), amoxicillina/acido clavulanico (AMCL), ampicillina (AMP), apramicina (APR), colistina solfato (CT), enrofloxacin (ENO), flumequina (FLUMEQ), gentamicina (GN), neomicina (N), ossitetraciclina (OT), sulfametoxazolo/trimethoprim (SXT), tetraciclina (TE), penicillina (PG), marbofloxacin (MAFL), lincomicina (MY). I ceppi di *Salmonella* spp. sono stati saggiati per la sensibilità ai seguenti 16 antimicrobici: acido nalidixico (ANA), ampicillina (AMP), cefotaxime (CEF), ciprofloxacin (CIP), cloramfenicolo (CLO), gentamicina (GN), kanamicina (KAN), streptomycin (STR), sulfonamidi (SUL), tetraciclina (TE), sulfametoxazolo/trimethoprim (SXT), colistina solfato (CT), amoxicillina/acido clavulanico (AMCL), enrofloxacin (ENO), cefalotina (CF), ceftazidime (CAZ).

Le analisi eseguite sulle feci provenienti da 248 vitelli bufalini hanno indicato la presenza di 188 (76%) campioni positivi per *E. coli*. Tra i ceppi isolati, 57 (23% dei casi di gastroenterite) sono risultati positivi alla ricerca di fattori di virulenza e/o di emolisine. Dei 57 ceppi isolati, 4 ceppi (2%) sono stati identificati come *E. coli* Enterotossici (ETEC), 13 (7%) come *E. coli* produttori di tossine Shiga (STEC) e 40 (21%) come *E. coli* Necrotossici (NTEC). Una percentuale considerevole di isolati (70%) è risultata negativa alla ricerca dei diversi fattori di virulenza in esame, rientrando probabilmente a far parte della naturale microflora intestinale degli animali. Tre ceppi ETEC sono risultati positivi alla ricerca del gene della tossina termolabile *lt*, mentre uno stipite è risultato positivo al gene della tossina termostabile *st*. Gli isolati STEC sono risultati tutti *stx* e intimina-positivi. In particolare, 9 isolati hanno evidenziato la presenza di *stx1*, 3 isolati di *stx2*, e 1 isolato sia di *stx1* che di *stx2*. Tra questi isolati, 5 (3%) hanno mostrato anche attività emolitica. I NTEC sono risultati il patotipo più frequentemente isolato (21%) nei vitelli bufalini affetti da diarrea. Tutti i ceppi NTEC hanno mostrato positività per il gene *cnf*. Tra gli isolati NTEC, 30 stipiti hanno dato risultato positivo alla ricerca del gene *cdt*, e 5 isolati hanno mostrato positività alla famiglia delle fimbrie F17. Tutti i NTEC bufalini hanno esibito anche attività emolitica, come spesso accade per i NTEC di origine umana o animale.

Le analisi per la ricerca di *Salmonella* spp. hanno individuato 49 campioni positivi (20% dei casi delle gastroenteriti). Tra i ceppi isolati, sono state identificate diverse sottospecie di *S. enterica*; quelle più frequenti sono risultate Typhimurium (13). I risultati della fagotipizzazione degli isolati di *S. Typhimurium* indicano una distribuzione variabile dei fagotipi, identificando 9 diversi profili di suscettibilità fagica, ovvero 1 DT1, 1 DT20, 2 DT104, 2 DT110, 1 DT194, 1 DT208, 2 U302, 2 RDNC, (reazione non conforme allo schema) e 1 NT (non tipizzabile).

I risultati molecolari indicano che tutti gli isolati di *S. Typhimurium* mostrano la presenza di *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siid*, *sopB*, *sspH2*, *stfE*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, e *fimA* e l'assenza di *sopE*. Altri loci erano variamente distribuiti fra i ceppi, con frequenze variabili fra 38-92%. Sulla base della presenza o assenza dei 24 loci inclusi nello studio, i 13 ceppi di *S. Typhimurium* sono stati suddivisi in 10 differenti genotipi (tabella 6); tuttavia, gli isolati con identico genotipo mostrano differente fagotipo suggerendo la presenza di 13 differenti ceppi.

Da notare in particolare che nessun ceppo di *E. coli* patogeno è stato isolato in associazione con *S. Typhimurium*.

Tutti i ceppi di *E. coli* patogeni sono stati testati per la sensibilità a 16 antibiotici. I ceppi di *E. coli* hanno mostrato percentuali di resistenza elevate, in particolare nei confronti di lincomicina (MY) (98%) e penicillina (PG) (93%), mentre percentuali di resistenza più basse sono state osservate per gentamicina (GN) e colistina solfato (CT) con valori del 26% e 9%, rispettivamente. Gli isolati di *E. coli* patogeni hanno mostrato profili di multi-antibiotico-resistenza estremamente variegati, con combinazioni di resistenze agli antibiotici quasi tutte diverse fra loro. Nell'88% dei casi, infatti, hanno esibito resistenza ad almeno 4 antibiotici diversi; in particolare, il 35% degli isolati è risultato resistente ad almeno 10 molecole antibiotiche, e di questi un isolato ha esibito 14 diverse resistenze. Nessun ceppo di *E. coli* ha mostrato un profilo di suscettibilità totale agli antibiotici testati.

Per quanto riguarda i ceppi di *Salmonella* spp. i tassi di resistenza più elevati sono stati riscontrati nei confronti di sulfonamidi (SUL) e tetraciclina (TE), con valori del 44% e 33%, rispettivamente, mentre suscettibilità totali sono state registrate nei confronti di cefotaxime (CEF), ciprofloxacina (CIP), colistina solfato (CT), enrofloxacin (ENO) e ceftazidime (CAZ). Come si può notare, il 24% degli isolati ha esibito resistenza ad almeno 4 molecole antibiotiche diverse. In particolare, i due ceppi di *S. Typhimurium* DT104 hanno esibito i profili str-sul-te e amp-str-sul-te, rispettivamente. Gli altri isolati di *S. Typhimurium* hanno mostrato profili variabili, da un numero di 7 resistenze diverse (1 isolato) a suscettibilità totali alle molecole testate (3 isolati).

I risultati della caratterizzazione dei patogeni consentono di definire alcuni aspetti delle gastroenteriti dei vitelli bufalini. Gli *E. coli* patogeni sono risultati piuttosto frequenti (23%). La caratterizzazione molecolare ha evidenziato i seguenti patotipi: ETEC (2%), STEC (7%) e NTEC (21%). In particolare, a differenza della specie bovina, nel vitello bufalino i ceppi ETEC sono stati rinvenuti piuttosto raramente. Ceppi STEC sono stati isolati nel 7% dei casi. La maggiore frequenza della tossina Stx1 rispetto alla Stx2 in ceppi *eae*-positivi è invece in accordo con quanto noto per la specie bovina, per la quale la Stx1 è spesso associata con ceppi *eae*-positivi e il gene *eae* è più frequente in ceppi STEC isolati da vitelli piuttosto che da soggetti adulti (Sandhu et al. 1996). I ceppi NTEC sono risultati i più frequenti nei vitelli bufalini affetti da gastroenterite (isolati nel 21% dei casi), e questo risultato è in accordo con dati riportati in letteratura relativi alla presenza di ceppi CNF-positivi sia in vitelli sani che diarroici (Blanco et al. 1993). La presenza diffusa di ceppi NTEC in vitelli bufalini e l'elevato numero dei fattori di virulenza espressi, evidenzia il potere patogeno di questo patotipo. Il potenziale patogeno di tutti i patotipi riscontrati in questo studio assume poi un peso ancora maggiore in relazione alla diffusissima presenza di resistenze multiple agli antibiotici (88% degli isolati di *E. coli* patogeni). Una tale frequenza risulta estremamente preoccupante in relazione alla possibilità di diffusione dell'antibiotico-resistenza, mediante trasferimento orizzontale del carattere ad altre specie microbiche, anche patogene.

Salmonella spp. ha esibito una prevalenza significativa (20%), maggiore rispetto a quella riportata in passato per i vitelli bufalini (11%) (Adlakha et al. 1992).

La caratterizzazione fenotipica (sierotipizzazione) degli isolati di *Salmonella* spp. ha mostrato una distribuzione estremamente variabile dei sierotipi in questa specie animale, con una prevalenza di *S. Typhimurium* (26%). I ceppi di *S. Typhimurium* hanno inoltre esibito una grande variabilità nella suscettibilità fagica. Il fagotipo DT104, che è spesso stato associato a ceppi dotati di resistenze multiple agli

antibiotici con accertato potere zoonosico, non sembra essere molto diffuso nel bufalo. Oltretutto, nell'ambito dei profili di antibiotico resistenza, i ceppi DT104 isolati in questo studio hanno esibito un minor numero di resistenze rispetto ad altri fagotipi. I nostri dati confermano l'assenza di un sierotipo specificamente adattato al bufalo (Fagiolo et al. 2005) e l'elevata variabilità del sierotipo Typhimurium (Mikasowa et al. 2005; Drahovska et al. 2007), prevalentemente correlata con i fattori di virulenza, e sottolineano l'alto potere discriminante delle tecniche di genotipizzazione utilizzate. I risultati di questo studio possono essere utili per lo sviluppo di efficaci protocolli di profilassi e terapia per il controllo delle infezioni dovute a *E.coli* e *Salmonella* nel bufalo e della possibile contaminazione della catena alimentare. La profilassi è importante per prevenire le infezioni. In generale la disponibilità di specifici vaccini, può portare ad una riduzione dell'uso di antibiotici, e di conseguenza, limitare l'emergenza di resistenze antimicrobiche.

Tubercolosi e ruolo dei geni dei recettori Toll-like nell'immunità innata del *Bubalus bubalis*

L'immunità innata svolge un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite da microrganismi patogeni, entra in azione subito dopo l'inizio dell'infezione, e si attiva per la distruzione dei patogeni in seguito al riconoscimento di specifici PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), strutture molecolari conservate e tipiche di microrganismi patogeni. Tale riconoscimento avviene grazie ad un sofisticato sistema di recettori, i recettori Toll-like (TLRs). Il legame tra il TLR e il suo ligando determina un segnale a cascata all'interno della cellula che produce un aumento dei fattori di trascrizione nucleare, responsabile a sua volta della produzione di specifiche citochine coinvolte nell'attivazione della risposta immunitaria (Trinchieri & Sher 2007).

Si è visto che i polimorfismi dei geni TLR sono associati alle patologie indotte dai micobatteri (Koets et al. 2010; Mucha et al., 2009; Sun et al., 2012; Pinedo et al., 2009).

I geni codificanti per i recettori toll-like presi in considerazione nella presente tesi sono stati il *TLR2* (recettore del peptidoglicano e lipoproteine), *TLR4* (recettore LPS) e *TLR9* (recettore di DNA batterico/non self). I Toll-like receptors 2 and 4 riconoscono i batteri inclusi i micobatteri, come riportato nei topi (Quesniaux et al. 2004). Nei bovini le mutazioni dei toll-like receptors 2 and 4 sono state associate all'infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Mucha et al., 2009). Il Toll-like receptor 2 riconosce molecole come il peptidoglicano e l'arabinomannano, presenti nella parete di questi microorganismi. Nel bovino la suscettibilità all'infezione paratubercolare è associata con SNPs nel *TLR2* (Koets et al. 2010). Il *TLR4* è coinvolto nel riconoscimento dei lipopolisaccaridi batterici nel topo (Poltorak et al., 1998) e nell'infezione paratubercolare nel bovino (Pinedo et al. 2009).

Il *TLR9* nei bovini è essenziale per il riconoscimento di particolari regioni del DNA batterico (CpG DNA) (Griebel et al. 2005), inoltre polimorfismi del *TLR9* bovino sono stati associati alla tubercolosi (Sun et al. 2012).

La specie bufalina è caratterizzata da 25 coppie di cromosomi (*Bubalus bubalis* 2n=50) (Amaral et al. 2008), i loci dei *TLRs* 2 and 9 sono localizzati sul cromosoma 17 e 21, rispettivamente, mentre il locus *TLR 4* si trova sul cromosoma 3 (Mittra et al. 2012). Il presente lavoro di tesi ha previsto la ricerca ed identificazione di polimorfismi in questi geni e l'analisi della loro potenziale associazione con la suscettibilità/resistenza genetica alla tubercolosi mediante uno studio caso-controllo.

I campioni analizzati derivano da 174 animali provenienti da 22 allevamenti presenti nella regione Campania. Per lo studio di associazione sono stati considerati come casi solo gli animali risultati positivi sia allo skin test che all'esame batteriologico per l'isolamento del *Mycobacterium bovis* (54 animali); sono stati invece considerati come controlli gli animali provenienti dagli stessi allevamenti dei casi e risultati negativi al test intradermico (120 animali). L'età minima dei controlli era di cinque anni, in modo da selezionare animali esposti al micobatterio, ma sempre risultati negativi al test intradermico. Per questi animali le sequenze codificanti dei tre geni sono state sequenziate e le sequenze ottenute sono state confrontate fra loro e con sequenze di riferimento presenti in GenBank (*TLR2*: HM756161; *TLR4*: HM469969; *TLR9*: HQ242778). Si è proceduto, successivamente alla ricostruzione degli aplotipi. La distribuzione degli alleli e degli aplotipi rilevati è stata analizzata mediante uno studio caso-controllo, al fine di verificare eventuali correlazioni significative con la malattia tubercolare.

L'analisi effettuata sulle sequenze dei geni dei *TLRs* bufalini ha permesso di identificare 18 SNP (single nucleotide polymorphism) nel *TLR2*, 9 SNP nel *TLR4* e 2 nel *TLR9*.

Lo studio caso-controllo effettuato sui polimorfismi identificati nei tre geni ha evidenziato la presenza di associazione per quattro di questi siti polimorfici con l'infezione tubercolare. Per quanto riguarda il *TLR2*, al sito polimorfico 381 A>G, il genotipo GG è risultato associato alla suscettibilità alla malattia (O.R. 52,25 I.C. 6,75 \pm 404,57), mentre il genotipo eterozigote AG è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi (O.R. 0,06 I.C. 0,01 \pm 0,25). Nel sito polimorfico 2064 T>C il genotipo TT è risultato associato alla suscettibilità alla malattia (O.R. 48,5 I.C. 10,88 \pm 216,26), mentre il genotipo omozigote opposto CC (O.R. 0,04 I.C. 0,01 \pm 0,13) è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi, costituendo un fattore protettivo nei confronti di tale patologia. La ricostruzione aplotipica eseguita, che determina la combinazione degli alleli sul singolo cromosoma, ha messo in evidenza la presenza di un aplotipo di *TLR2* associato alla resistenza alla patologia. Nel *TLR4* il genotipo CC del sito polimorfico 672 A>C è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi (O.R. 0,28 I.C. 0,10 \pm 0,76), ma in questo caso nessuno degli aplotipi ottenuti ha mostrato un'associazione significativa. Nel *TLR9* l'analisi rivela un sito polimorfico (2340 C>T) che presenta il genotipo C/C (O.R. 0,33 I.C. 0,11 \pm 0,92) associato alla resistenza alla tubercolosi, ma anche in questo caso nessuno degli aplotipi ottenuti ha mostrato un'associazione significativa.

Conclusioni

I risultati riportati in questo studio riguardo ai patogeni gastrointestinali del bufalo confermano l'ampia e variegata presenza di ceppi diversi di patogeni in vitelli bufalini affetti da gastroenterite, è quindi sempre necessario effettuare l'indagine su più soggetti della stessa azienda, in modo da ottenere un quadro completo dei ceppi patogeni presenti in allevamento ai fini di una corretta diagnosi e di un'efficace terapia. Quest'ultima non può non tener conto dell'antibiotico-resistenza mostrata in particolar modo da *E. coli* e, in minor misura, da *Salmonella* spp.

La diffusa presenza di differenti ceppi patogeni, la capacità di resistenza agli antimicrobici, nonché la capacità di sopravvivenza ambientale di molti degli agenti eziologici studiati portano a concludere che occorre investire molto in termini di prevenzione. Questa deve basarsi sull'impiego di idonee procedure di pulizia, igiene e disinfezione ambientale. Inoltre, di fondamentale importanza risulta la profilassi

immunizzante basata soprattutto sull'utilizzo di specifici vaccini stabulogeni, data la peculiarità di molti degli agenti patogeni messi in evidenza. Infine, considerata la valenza zoonosica di alcuni di essi, l'applicazione di efficaci misure di biocontrollo determina un indubbio vantaggio in termini di sanità pubblica conseguente alla riduzione del rischio di contaminazione dei prodotti di filiera e dell'ambiente di allevamento.

Riguardo ai risultati relativi allo studio sulla resistenza/suscettibilità alla malattia, l'analisi effettuata sulle sequenze dei geni dei *TLRs* bufalini ha permesso di identificare 18 SNPs (single nucleotide polymorphisms) e lo studio caso-controllo effettuato su questi polimorfismi ha evidenziato la presenza di associazione per alcuni di essi con l'infezione tubercolare. Un aspetto interessante risiede nel fatto che tutti gli SNPs per cui l'analisi statistica ha verificato un'associazione alla malattia siano SNPs sinonimi. Sebbene questo tipo di mutazioni non impattino di norma sulla suscettibilità/resistenza alla malattia, essendo ininfluenti sulla composizione aminoacidica della proteina codificata, diversi studi (Sauna *et al.* 2007; Chamarye & Hurst 2009) hanno dimostrato che anche questi polimorfismi possono avere effetti su alcuni dei più importanti processi che regolano la sintesi delle proteine e di conseguenza sul fenotipo. Per quanto riguarda i meccanismi in cui queste mutazioni potrebbero essere coinvolte, si è visto che possono interferire con la sintesi proteica, essendo alcune triplette tradotte preferenzialmente, lo splicing, la stabilità dell'mRNA, l'affinità per le proteine regolatrici.

Un'ipotesi alternativa al coinvolgimento diretto di queste mutazioni è che una o più mutazioni non sia direttamente correlata alla resistenza/suscettibilità, ma sia in linkage con altre mutazioni funzionali non ancora identificate, sullo stesso cromosoma.

I dati che vengono riportati indicano che i polimorfismi dei geni coinvolti nella risposta immunitaria alla tubercolosi nel bufalo (*Bubalus bubalis*), possono avere un ruolo nella risposta dell'ospite a questa patologia. Studi successivi saranno necessari per comprendere il meccanismo d'azione dei polimorfismi identificati. La selezione genetica, come mezzo per aumentare la frequenza dei geni di resistenza nell'ambito di un allevamento è un approccio emergente che potrebbe avere un impatto positivo sull'economia dell'industria lattiero casearia e contribuire a cambiare la cultura del controllo delle malattie tramite l'abbattimento degli animali.

1. INTRODUCTION

The Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis* Fig. 2) is one of the most important livestock species bred in Italy and particularly in Southern Italy. Its economic importance is due to the production of the worldwide famous mozzarella cheese (*Mozzarella di Bufala Campana*).

Among the major pathogens with zoonotic potential affecting water buffalo species a crucial role is played by *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., responsible for gastrointestinal diseases and *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis.

The mozzarella cheese specifications allow the use of raw milk (Coppola *et al.* 1988). It is therefore mandatory the use of milk collected from brucellosis and tuberculosis free herds. Tuberculosis causes serious economic losses in the livestock industry, this disease has not yet been eradicated and actually there is an increase of new cases. The prophylaxis for gastrointestinal pathogens requires strict hygienic measures and allows the use of specific vaccines. By contrast, for *Mycobacterium bovis* the Italian National Program for the tuberculosis control and eradication, prohibits vaccination. In particular, the Italian National Plan imposes culling of all the subjects positive to the delayed hypersensitivity test (skin test) and after animal slaughtering, microbiological processing of the lymphoid tissue for isolation of *Mycobacterium bovis* (OIE, 2013).

In this context the gastrointestinal pathogens were studied to well characterize them and allow the production of effective autogenous vaccines, while for tuberculosis a molecular characterization of host genes (*Bubalus bubalis* toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, toll-like receptor 9) has been performed. Indeed the genetic variation within the host may play a crucial role in the immunity to infections and the consequent resistance or susceptibility to disease, and selective breeding for disease-resistant genotypes is an emerging approach for the disease control (Adams & Templeton 1998; Bishop & MacKenzie 2003). The role of genes in protection also against bacterial infections previously shown in water buffalo (Borriello *et al.* 2006, Capparelli *et al.* 2007) prompted the search for polymorphisms conferring resistance to mycobacterial infection in this species.

The genetic selection, as a mean to increase the frequency of genes providing resistance to infection diseases, may have a positive impact on the economics of dairy industry and contribute to change the culture of animal health control by slaughter.

1.1 Gastrointestinal pathogens

High mortality rates in water buffalo calves 1-4 weeks old are caused by gastroenteric pathologies primarily characterized by diarrhea.

Water buffalo calves are more frequently affected by gastroenteritis than bovine calves, with mortality rates as high as 70% in water buffalo species vs. 50% in bovine species (Fagiolo *et al.* 2005; Foster & Smith 2009). This difference might be due to a greater susceptibility of water buffalo to gastroenteric pathogens, although it also may reflect the lack of appropriate management practices for this animal species. Therefore, water buffalo represents a suitable model to study causative agents of gastroenteritis.

The spread of such pathogens among domestic ruminant herds might cause additional concern related to the emergence and dissemination of antibiotic resistant

bacteria in response to the wide use of antimicrobial molecules to address infectious diseases in young animals (van den Bogaard and Stobberingh, 2000).

The main etiological agents are *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, rotavirus, coronavirus, and *Cryptosporidium* spp. Among these pathogens, a predominant role is played by *E. coli* and *Salmonella* spp., alone or in combination with other microorganisms. These etiological agents are responsible for serious economic losses in livestock and are zoonotic agent responsible for foodborne illness (Fagiolo et al., 2005).

Escherichia coli infections can be caused both in humans and animals by different pathovars, most frequently identified as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC). These pathovars can induce a variety of diseases, such as diarrhea, haemorrhagic colitis, and extra intestinal infections (Croxen and Finlay, 2010). Their pathogenic mechanisms can be attributed to different virulence factors including enterotoxins and colonization factors such as flagella, fimbriae, capsule, lipopolysacchride and adhesins (Croxen and Finlay, 2010; Gyles and Fairbrother, 2010). In addition, other pathovars such as necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) can often be isolated from extra intestinal infections, and are found to possess a cytotoxic necrotizing factor (CNF), as well as a cytolethal distending toxin (CDT). Some or all of these pathovars can also express other virulence factors such as intimin, encoded by the *eae* gene (Croxen and Finlay, 2010), and haemolysins, acting as pore-forming cytolysins on eukaryotic target cells (Mainil and Daube, 2005).

Salmonella-induced diseases, in water buffalo calves as for bovine calves, are characterized by severe gastrointestinal lesions, profuse diarrhea, and severe dehydration (Fagiolo et al., 2005). Acute salmonellosis generally induces diarrhea, mucous at first, later becoming bloody and fibrinous, often containing epithelial casts. Ingestion is the main route of infection, although it can also occur through the mucosa of the upper respiratory tract and conjunctiva. The major source of infection in the herd is represented by asymptomatic older animals shedding heavy loads of bacteria through feces. Other sources of infection are contaminated forages and water, as well as rodents, wild winged animals, insects and man (Fagiolo et al., 2005; Quinn et al. 2011). The disease can also cause sudden death without symptoms. Occasionally, the infection is systemic, affecting joints, lungs and/or the central nervous system (CNS). Moreover, several *Salmonella* serovars seem to be able to infect water buffalo, mainly affecting 1-12 week old calves, even though reports on salmonellosis in *B. bubalis* are scarce (Fagiolo et al., 2005; Adlakha & Sharma 1992).

In water buffalo, *S. enterica* serovar Typhimurium can induce a variety of clinical syndromes with different anatomopathological lesions (Fagiolo et al., 2005; Adlakha & Sharma 1992). The severity of the disease can depend on several factors, including host-pathogen interactions, which is highly influenced by the route of infection, the infectious dose, natural or acquired host resistance factors, and the possible presence of other pathogens. Moreover, specific *Salmonella* virulence factors, frequently located on *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), prophage regions or virulence plasmids, play a key role in the pathogenesis of the gastroenteritis (Barrow et al. 2010).

1.2 Tuberculosis and role of TLR gene in the *Bubalus bubalis* innate immunity

Tuberculosis is a chronic bacterial disease of *Bubalus bubalis* resulting from infection by *Mycobacterium bovis*, a Gram positive, acid-fast bacterium. This disease can spread easily to humans typically by the inhalation of aerosol, ingestion of unpasteurized milk or through breaks in the skin. In developed countries, eradication programs have reduced or eliminated tuberculosis in livestock animals, and human diseases is now rare; however, reservoirs in wildlife can make complete eradication difficult. Tuberculosis is usually a chronic debilitating diseases but it can be acute and rapidly progressive. Early infection are often asymptomatic, in late stage, common symptoms include progressive emaciation, a low-grade fluctuating fever, weakness, inappetence and acute respiratory distress.

Animals exposed to *M. bovis* can become infected and develop disease or may have the ability either to clear the bacteria effectively or control them, possibly in a condition of latency. This concept has significant implications for disease control and eradication programmes. Among skin test positive animals, there might be a proportion in which tuberculous pathology or *M. bovis* may never be detected at either abattoir inspection or on laboratory examination. Such animals are a considerable number of animals slaughtered without tuberculous lesions being detected (Pollock & Neill 2002).

Studies that lead to a characterization of the immune responses of buffalo that have been exposed to *M. bovis*, without developing diseases, should provides important knowledge. Detailed study of this category of animal may well improve understanding of protective immunity.

Microbial infection initiates complex interactions between the pathogen and the host. Pathogens express several signal molecules, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are essential for survival and pathogenicity. Recognition of PAMPs triggers an array of anti-microbial immune responses through the induction of various inflammatory cytokines (Trinchieri & Sher 2007).

Toll-like receptors (TLRs) (Fig. 3) are transmembrane proteins that play a key role in innate immunity by recognizing pathogens and subsequently activating appropriate responses (Fig. 4) (Akira *et al.* 2001; Takeuchi & Akira 2001; Takeda & Akira 2004).

The mechanisms by which the recognition of Toll-like receptor (TLR) ligands leads to host immunity remain poorly defined. It is now thought that in order to induce an effective immune response, microorganisms must stimulate complex sets of pattern-recognition receptors (PRR), both within and outside of the TLR family. The combined activation of these different receptors can result in complementary, synergistic or antagonistic effects that modulate innate and adaptive immunity. Therefore, a complete understanding of the role of TLRs in host resistance to infection requires 'decoding' of these multiple receptor interactions.

Toll-like receptor (TLR) signalling involves not only nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation, but also mitogen-activated protein kinases, phosphatidylinositol 3-kinase and several other pathways that markedly affect the overall biological response to the activation of TLRs.

Mammalian Toll-like receptors (TLRs) are a family of at least 12 membrane proteins that trigger innate immune responses through nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent and interferon (IFN)-regulatory factor (IRF)-dependent signalling pathways (Akira *et al.* 2006) TLRs are evolutionarily conserved molecules and were originally identified in vertebrates on the basis of their homology with Toll, a molecule that stimulates the

production of antimicrobial proteins in *Drosophila melanogaster* (Lemaitre 2004; Medzhitov *et al.* 1997).

It is of note that Toll was functionally defined on the basis of its crucial role in determining the resistance of *D. melanogaster* to infection with fungi and Gram-positive bacteria (Lemaitre 2004). By contrast, mammalian TLRs have been functionally characterized and distinguished mainly on the basis of their stimulation by different ligands *in vitro*. Moreover mice that are deficient in a single TLR rarely show the extreme susceptibility to pathogenic infection that was originally observed in *D. melanogaster* with a functional deletion of Toll (Fritz & Girardin 2005). These considerations have led to questions concerning whether the role of Toll in host resistance to infection in *D. melanogaster* is comparable to the role of TLRs in mammalian immune defence, and the functional significance of TLR diversification in vertebrate hosts. The TLR-family members are pattern-recognition receptors (PRRs) that collectively recognize lipid, carbohydrate, peptide and nucleic-acid structures that are broadly expressed by different groups of microorganisms. Some TLRs are expressed at the cell surface, whereas others are expressed on the membrane of endocytic vesicles or other intracellular organelles. TLRs are composed of an ectodomain of leucine-rich repeats (LRRs), which are involved directly or through accessory molecules in ligand binding, and a cytoplasmic Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor (TIR) domain that interacts with TIR-domain-containing adaptor molecules (Takeda *et al.* 2003). The structural basis of ligand binding by TLRs is poorly understood and several unexpected crossspecificities (for example, the recognition by TLR9 of both CpG-containing oligodeoxynucleotides (ODNs) and malaria haemozoin) have been described. The early hypothesis that individual TLRs might have evolved to recognize distinct phylogenetic groups of pathogens has been mainly abandoned because of the well-documented, broad recognition of microbial products (both pathogenic and non-pathogenic) belonging to diverse species and *phyla* by many of the TLRs. In addition, the recognition of endogenous ligands by TLRs is now thought to have an important role in the regulation of inflammation, both in infectious and non-infectious diseases. However, the precise identification of these endogenous ligands has remained controversial because of their possible contamination with microbial products. The function of TLRs is further diversified by the different signalling pathways that can be induced by ligand interaction (Akira *et al.* 2006).

Toll-like receptors (TLRs) are characterized by an extracellular N-terminal domain constituted by 16 to 28 leucine rich repeats (LRR) involved in ligand recognition (Wei *et al.* 2009), and an intracellular C-terminal domain known as the toll/IL-1 receptor (TIR) domain, required for the interaction and recruitment of various adaptor molecules to activate the downstream signalling pathways (Medzhitov 2001). Their polymorphisms have been associated with high susceptibility to mycobacteria, the causative agent of bovine tuberculosis (Koets *et al.* 2010; Mucha *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012; Pinedo *et al.*, 2009). Toll-like receptors 2 and 4 mediate their effects by recognizing bacteria, including mycobacteria, their sensitivity to mycobacterial antigens has been reported in mice (Quesniaux *et al.* 2004). In cattle, toll-like receptors 2 and 4 gene mutations were found to be associated to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection (Mucha *et al.*, 2009).

Toll-like receptor 2 is sensitive to peptidoglycan and to lipoarabinomannan molecules present in the cell wall of these microorganisms. In cattle susceptibility to paratuberculosis infection is associated with SNPs in TLR2 gene (Koets *et al.* 2010). Toll-like receptor 4 is involved in bacterial lipopolysaccharide recognition in mice

(Poltorak *et al.*, 1998) and in paratuberculosis infection in cattle (Pinedo *et al.* 2009). Bovine toll-like receptor 9 is essential for responses to bacterial DNA and in particular to unmethylated CpG dinucleotide (CpG DNA) (Griebel *et al.* 2005), in Chinese Holstein cattle, polymorphism in TLR9 genes were found to be associated to tuberculosis susceptibility (Sun *et al.* 2012).

In the river buffalo, each cell contains 25 chromosome pairs (*Bubalus bubalis* 2n=50) (Amaral *et al.* 2008), the *TLRs* 2 and 9 loci are localized on chromosome 17 and 21, respectively, while the *TLR* 4 locus is located on chromosome 3 (Mitra *et al.* 2012).

1.3 Aims

The objectives of the current study were to perform (I) a molecular characterization of the virulence factors of *E. coli* and *Salmonella* spp. and (II) a molecular characterization of genes involved in the immune response of water buffalo.

In the first part of the study the intestinal contents were investigated in water buffalo calves, affected by severe diarrhea with a lethal outcome for the presence of the pathogens *E. coli* and *Salmonella* spp. Pathogenic *E. coli* strains were isolated and characterized for the presence of the main virulence factors and for haemolytic activity. *Salmonella* spp. strains were isolated and characterized by serotyping, phage-typing and presence of virulence factors. The *E. coli* and *Salmonella* isolates were further characterized for the resistance to 16 antibiotics.

In the second part of the thesis a case-control study was performed to characterize the distribution of polymorphisms in three bubaline candidate genes (toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, toll-like receptor 9) and to test their role as potential risk factors for tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Genetic characterization of bubaline gastrointestinal pathogens

Escherichia coli and *Salmonella* spp. characterization was carried out using samples taken from 248 water buffalo calves, bred in 25 different farms located in the Campania region during the years 2009-2010. The animals were aged between 1-4 weeks old and were all affected by gastroenteritis with lethal outcome. They were sent to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno for post-mortem analysis. During necropsy, the intestinal lesions were evaluated and pools of fecal material from small and large intestines were aseptically collected, kept at 4°C and within 24 hours, processed for the detection of *E. coli* and *Salmonella* spp.

2.1.1 *Escherichia coli*

Fecal samples (10 g) for *E. coli* isolation were homogenized and serially diluted in saline peptone water, plated onto MacConkey's agar (Oxoid, Hampshire, UK) and incubated overnight at 37°C. *E. coli* was considered as plausibly related to the diarrhoeic syndrome only when exhibiting a concentration of at least 10⁸ CFU/g of intestinal content (Acres, 1985), and the corresponding samples were therefore considered as positive to *E. coli* detection.

2.1.1.1 Virulotyping

All the *E. coli* isolates were screened by PCR for the presence of the genes encoding for specific virulence factors: Shiga toxin (stx₁, stx₂), cytotoxic necrotizing factors (CNF), cytolethal distending toxin (CDT), *eae* (intimin), heat-stable (ST) and heat-labile (LT) enterotoxin, F₁₇ (fimbriae) (Tab. 1). Bacterial DNA was extracted by boiling a single colony suspended in 100 µl of water at 100°C for 10 min and pelleting cellular debris. DNA amplification was performed in a final reaction volume of 50 µl containing 10 µl of template DNA, reaction buffer 1X, MgCl₂ 1.2 mM, dNTPs 0.2 mM each, 50 pmol of each primer, 2U of Taq polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Primers and PCR conditions for each amplification are summarized in Table 1. PCR products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gels and visualized under UV light after ethidium bromide staining.

2.1.1.2 Haemolysis test

Haemolysin production was evaluated based on the method by Beutin et al. (1989) by inoculation of bacterial strains onto blood agar base (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10 mM CaCl₂ and sheep blood cells (Oxoid) washed with PBS. The plates were incubated at 37°C and observed for haemolysis after 24 h (Fig. 1).

2.1.2 *Salmonella* spp.

The isolation of *Salmonella* spp. was performed according to the ISO 6579:2002. The isolated *Salmonella* spp. were serotyped according to the Kaufmann-White scheme (Grimont & Weill 2007). Phage-typing of the isolated *S. Typhimurium* strains was performed by the Italian National Reference Centre for Salmonellosis (Istituto

Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) according to the protocol of the International Phage-typing Reference Laboratory (Health Protection Agency, London, UK). Salmonella strains within a particular serovar may be differentiated into a number of phage types by their pattern of susceptibility to lysis by a set of phages with different specificity. Test strain from the culture was inoculated into a test tube containing 4 mls of double strength Difco nutrient broth and the inoculated broth tubes was incubated on a horizontal shaker at 37°C for 1-1.5 hours and was incubated at 37°C without agitation for 1.25 hours. The broth culture was flooded over the surface of a dried Difco nutrient agar plate. When the surface of the nutrient agar plate is dry, the appropriate typing phages was applied at routine test dilution (RTD) to the dried surface. When the phage spots were dried, the Difco nutrient agar plates were incubated inverted at 37°C for 5-18 hours. The phage typing plates were removed from the incubator and the phage reactions were read using a x10 aplanat hand lens (or alternative methods of magnification) through the bottom of the plates using both direct and oblique illumination. The susceptible phage regions will show a circular clearing where the bacteria have been lysed, and this is used in differentiation.

2.1.2.1. Virulotyping

Bacterial DNA was extracted from 1 ml of overnight cultures using Chelex 100 Resin (BioRad, Hercules, CA) and used as the template for the PCR. *S. Typhimurium* strains were characterized by the molecular detection of 24 genes coding for virulence factors. The genetic characterization (Table 2) included six sites (*invA*, *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, and *sopB*) located on the Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1-5, respectively (Huen et al.2009), eight sites (*gipA*, *gtgB*, *sopE*, *sodC1*, *gtgE*, *gogB*, *sspH1*, and *sspH2*) of prophage origin (Mikasowa et al. 2005; Chiu & Ou 1996; Hopkins & Threlfall 2004), the gene *spvC*, located on a virulence plasmid (Chiu & Ou 1996), and nine genes (*stfE*, *safC*, *csgA*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, *pefA*, *fimA*, and *agfA*) coding for bacterial fimbriae, involved in surface adhesion and gut colonization (Barrow et al. 2010). The primers used to amplify the genes *sspH1*, *sspH2*, *ssaQ*, *sopB*, *siiD*, *stfE*, *safC*, *csgA*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, and *fimA* were designed using the Primer3 software (version 0.4.0; <http://frodo.wi.mit.edu/>), and PCR was performed in a final volume of 25 µL containing HotStar Taq Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) 1x, 0.4 µM each primer and 1 µL of extracted DNA. The thermal profile included an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 5 min. Amplification products were visualized under ultraviolet (UV) light after electrophoresis on 2% agarose gels and visualized under UV light after ethidium bromide staining.

2.1.2.2 *E. coli* and *Salmonella* antimicrobial resistance

Antimicrobial susceptibilities of all the *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated were determined by the agar disk diffusion method on Mueller-Hinton Agar (Oxoid) according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2008). The *E. coli* isolates were assayed for susceptibility to the following 16 antimicrobials: nalidixic acid (Na) – 30 µg, amoxicillin (Amc) – 10 µg, amoxicillin/clavulanic acid (Amcl) - 30µg, ampicillin (Amp) – 10 µg, apramycin (Apr) – 15 µg, colistin sulphate (Ct) - 10µg, enrofloxacin (Enr) - 5µg, flumequin (flu) – 30 µg, gentamicin (Cn) - 10µg,

neomycin (N) –30µg, ossitetracycline (Ot)–30µg, sulphamethoxazole/trimethoprim (Sxt) - 25µg, tetracycline (Te) – 15 µg, penicillin.(Pg)– 15 µg, marbofloxacin (MafI) – 15 µg, lincomycin (My) – 15 µg.

The *Salmonella* spp. isolates were assayed for susceptibility to the following 16 antimicrobials: nalidixic acid (Na) – 30 µg, ampicillin (Amp) – 10 µg, cefotaxime (cef) – 15 µg, ciprofloxacin (cip) – 15 µg, chloramphenicol (clo) – 15 µg, gentamicin (Cn) - 10µg, kanamycin (kan) – 15 µg, streptomycin (str) – 15 µg, sulfonamide (sul) – 15 µg, tetracycline (te) – 15 µg, sulphamethoxazole/trimethoprim (Sxt) - 25µg, colistin sulphate (Ct) - 10µg, amoxicillin/clavulanic acid (Amc) - 30µg, enrofloxacin (Enr) - 5µg, cephalotin – 15 µg, ceftazidime (caz) – 15 µg.

Inhibition diameters were measured and interpreted as resistant, intermediate or susceptible according to CLSI guidelines (CLSI, 2008).

2.2 Genetic characterization of *Bubalus bubalis* toll-like receptor genes

2.2.1 Study design

The genetic association was studied by means of a case-control approach on 174 water buffaloes from 22 herds in the Campania region. Samples collection was performed within the Italian National Plan for the tuberculosis control, based on a test-and-slaughter approach. Our analyses, performed during the period 2009-2011, exhibited the presence of 54 animals positive to both intradermal TB test and *M. bovis* microbiological isolation. These 54 animals were therefore classified as cases for the case-control study. The choice of the microbiological test to confirm cases identification was considered in order to exclude the possibility of false-positive subjects diagnosed by the delayed hypersensitivity test. The control subjects were collected among the animals which tested negative to repeated intradermal TB tests (at least three tests) during the entire period of the study. The control animals were at least five years-old, and were born and raised in the same herds of cases to ensure an equal level of exposure to infection.

2.2.2 Sample size calculation

The size of the control group was estimated based on a prevalence of the infection of 15%. An odds ratio value of 2.0 was established as a threshold for significance, with a ratio for cases and controls of 1:2 (power = 80%, confidence = 95%) (Pinedo et al., 2009). Based on these parameters, with an imposed number of cases (54), the required number of controls was 108 for a one-tailed analysis. The present case-control study therefore included 54 cases and 120 controls.

2.2.3 Protocol of sample analysis

DNA was extracted from blood (control animals) and lymph node (cases) samples using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. PCR primers for amplification of the CDS of the genes *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* are shown in table 3, where T_{ann} is the annealing temperature specifically indicated for each primers pair. The *TLR2* coding sequence was amplified using two primer pairs according to the following touchdown PCR protocol: initial step of 7 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 65°C (decreasing by 1°C after each cycle), 1 min 30 s at 72°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min

at 58°C, 1 min 30 s with a final extension of 10 min at 72°C. The *TLR4* CDS was amplified using four primers sets with the following thermal profile: 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at T_{ann} and 45 s at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. The *TLR9* CDS was amplified using six primer sets with the following thermal profile: 5 cycles of 30 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 15 s at 72°C followed by 30 additional cycles of 20 s at 95°C, 20 s at T_{ann} , and 30 s at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. All thermal profiles included an initial step at 95°C for 15 min for Taq DNA polymerase activation. The reaction mixture included 5 ng/μl of genomic DNA, 0.5 μM each primer (forward and reverse), 1X HotStar Taq Master Mix (Qiagen) in a final volume of 25 μl. Amplicons were purified (QiaQuick purification kit, Qiagen), bi-directionally sequenced using the Big Dye Terminator cycle sequencing kit v.1.1 or v.3.1 (Life Technologies) and purified using the DyeEx spin kit (Qiagen). Samples (5 μl) were denatured with 10 μl of Hi-Di formamide (Life Technologies) at 95°C for 5 min, and separated by capillary electrophoresis on either ABI PRISM 310 or 3130 sequencers (Life Technologies). Sequencing data were manually inspected by the Sequencing Analysis software v5.4 (Life Technologies).

2.2.4 SNP selection and genotyping

For the same DNA region, each forward and reverse sequence obtained from a single DNA sample was aligned with the sequences obtained from all the other samples. In order to generate a consensus sequence and to identify polymorphisms among the samples, the sequences were analyzed for multiple alignment using BioEdit v.7.1.3 (Hall, T.A. 1999) and SeqManII 5.00 software (DNASTAR Inc.) (Fig. 8 and 9). In addition the obtained water buffalo sequences of the *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes were also aligned with the sequences publicly available in GenBank: accession HM756161 (*Toll-like receptor 2 gene*, complete cds), accessions JN786600 (*Toll-like receptor 4 gene*, complete cds), and accession HQ242778 (*Toll-like receptor 9 gene*, complete cds).

2.2.5 Genetic association analysis

Genotype frequencies were tested for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) by using the Chi-square test (χ^2).

Odds Ratios (OR) for associated genotypes comparing infected versus healthy animals were calculated with a 95% confidence interval (CI) and *P*-values of the chi-squared test of independence (χ^2) for the association of SNPs were calculated for this genetic model by using Vassarstat software (Richard Lowry, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

Haplotype reconstruction was performed by means of PHASE software, version 2.1 (Stephens, M. 2004).

3. RESULTS

3.1 Genetic characterization of bubaline gastrointestinal pathogens

3.1.1 *E. coli*

Our study carried out on 248 buffalo calves indicated the presence of 188 (76%) *E. coli* positive samples. The collected *E. coli* isolates were tested by phenotypic and molecular analyses for the identification of ETEC, STEC and NTEC. As a result of the molecular screening for virulence factors 57 isolates were identified as positive: 4 ETEC, 13 STEC and 40 NTEC (Tab. 4). A considerable number (131) of isolates did not harbour the virulence factors investigated and were most probably part of the gut's natural commensal microflora.

Three of the ETEC isolates could produce LT, but were negative to ST detection and only one isolate could produce ST. The STEC isolates were all Stx and intimin-positive. In particular 9 isolates were Stx1-positive, 3 isolates were Stx2-positive, and 1 isolate was positive to both Stx1 and Stx2. Among these isolates, 5 (3%) also exhibited haemolytic activity (hly) (figure 9) as shown in the Table 4.

NTEC was the most prevalent pathovar among diarrhoeic water buffalo calves. All the NTEC strains could produce CNF and hly (haemolysin). Among CNF positive NTEC, 30 isolates had the *cdt* gene, and 5 isolates produced one of the F17-related fimbriae.

All the *E. coli* isolates were tested for susceptibility to 16 antimicrobials among those most commonly used in veterinary medicine (table 5). They were all characterized by multi-drug resistance profiles. High rates of resistance were observed for lincomycin (my) (98%) and penicillin (pg) (93%), while the lowest resistance rates were exhibited for gentamicin (gn), and colistin sulphate (ct) with resistance percentages of 26% and 9%, respectively.

3.1.2 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. were isolated from ~ 20% (49 positive samples) of the intestinal contents collected from water buffalo calves affected by gastroenteritis with lethal outcome. The *S. enterica* serovars most frequently isolated were Typhimurium (n=13), Muenster (n=5) and Give (n=5). The diagnostic investigation indicated that remarkably *S. Typhimurium* was never associated with pathogenic *E. coli*.

Phage-typing of the *S. Typhimurium* (table 6) that was performed by the Italian National Reference Centre for Salmonellosis (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie), indicated a variable distribution among strains with nine different phage types: 1 DT1, 1 DT20, 2 DT104, 2 DT110, 1 DT194, 1 DT208, 2 U302, 2 RDNC (nonstandard reaction) and 1 NT (impossible to do the phage type).

The molecular results indicated that all the *S. Typhimurium* isolates displayed the presence of *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, *sopB*, *sspH2*, *stfE*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, and *fimA* genes, and the absence of the *sopE* gene, therefore these genes can't be useful to discriminate among the nine different phage types. By contrast other 11 loci were variably distributed among the strains, with frequency values ranging from 38-92% (table 6). Using these loci 10 different genotypes (virulotypes) were identified that present the following differences in the virulence genes: genotype 1 (*gtgB*, *gogB*, *sspH1*, *sodC1*, *gtgE*, *spvC*, *safC*, *csgA*, *pefA*); genotype 2 (*gtgB*, *gogB*, *sspH1*, *sodC1*, *gtgE*, *spvC*, *safC*, *csgA*, *pefA*, *agfA*); genotype 3 (*sspH1*, *csgA*); genotype 4

(gipA, gtgB, gogB, sspH1, sodC1, gtgE, safC, csgA); genotype 5 (gtgB, gogB, sodC1, gtgE, spvC, safC, csgA, pefA); genotype 6 (gtgB, gogB, sodC1, gtgE, spvC, safC, csgA, agfA); genotype 7 (gipA, gtgB, gogB, sodC1, gtgE, safC); genotype 8 (gipA, gtgB, gogB, sspH1, gtgE, safC, csgA, agfA); genotype 9 (gipA, gtgB, gogB, sspH1, gtgE, spvC, safC, csgA, agfA); genotype 10 (gipA, gtgB, gogB, sspH1, gtgE, safC, csgA, agfA);

The virulotyping of the *S. Typhimurium* strains, based on the presence or absence of the 24 loci included in this study, showed 10 different genotypes and the phage-typing displayed nine different phage types. The majority of the different strains showed different virulotype and phage types, but it is important to highlight that different phage type showed identical genotype (e.g. phage type DT104 and U302 both exhibit genotype 5), and also that in some cases different genotypes showed identical phage type (e.g. genotype 2 and genotype 5 both display phage type DT104). Using both techniques, phage-typing and virulotyping, 13 different strains were better characterized and discriminated.

High rates of resistance were observed for sulphonamide (sul) (44%) and tetracycline (te) (33%), while the high susceptibility rates were exhibited for cefotaxime (cef), ciprofloxacin (cip), colistin sulphate (Ct), colistin sulphate (ct), enrofloxacin (Enr). The table n.7 shows that 24% of isolated exhibited resistances to almost four different molecules. In particular two isolated of *Salmonella typhimurium* DT104 exhibited profiles Str-Sul-Te and amp- Str-Sul-Te respectively. The other isolated showed variable profiles, from seven different resistances (1 isolated) to a total susceptibility.

3.2 Genetic characterization of *Bubalus bubalis* toll-like receptogenes.

3.2.1 Identification of SNPs.

The water buffalo *TLR2* and *TLR9* genes consist of two exons, while the *TLR4* consists of three exons (Figs. 5, 6, 7). The analysis of the entire CDSs enabled to identify 29 new SNPs in our samples, none of which was reported in GeneBank (Table 8). Specifically, 18 were identified in *TLR2* (5 non-synonymous and 13 synonymous), 9 in *TLR4* (4 non-synonymous and 5 synonymous), and 2 in *TLR9* (both synonymous). All the SNPs found were bi-allelic with the exception of a tri-allelic SNP (572 A>CG) found in *TLR4*. In addition we identified a dinucleotidic SNP (482/483 GC>CT) in *TLR2*. Protein domain of *TLR2* and *TLR4* non-synonymous SNPs are shown in 9 and 10 respectively.

3.2.2 Case-control study

Calculation of the allelic and genotypic frequencies, and application of the χ^2 test, revealed that both populations (cases and controls) conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium with regard to all the polymorphic sites ($P > 0.05$) of the *TLRs* 2, 4 and 9 genes (Tables: 11, 12 and 13).

For each detected SNP, the frequency distributions of each possible genotype in both groups of animals (cases and controls) was evaluated by calculating the Odds Ratio (OR) and applying the χ^2 test of independence (Tables: 14, 15 and 16). Within of the 29 analysed polymorphic sites (Table 17), 4 SNPs exhibited statistically significant differences in frequency distribution of one or more associated genotypes between cases and controls. In particular, two SNPs were located in the *TLR2* gene

(381 A>G and 2064 T>C), one SNP in *TLR4* (672 A>C) and one in *TLR9* (2340 C>T).

In the *TLR2* gene, the SNP at 381 A>G site included the GG genotype that exhibited an OR of 52.25 (95% CI= 6.75 to 404.57) and a χ^2 test of independence with a significant *P*-value (*P*<0.001), indicating a strict correlation between this genotype and susceptibility to tuberculosis. In the same polymorphic site, a significant *P*-value (*P*<0.001) and a significant OR (OR= 0.06, 95% CI= 0.01 to 0.25) were also observed for the heterozygous A/G genotype. However, in this case, an OR value far below 1 indicates a likewise strong correlation with resistance to the disease. In the same gene, the homozygous T/T genotype at the 2064 T>C polymorphic site, proved to be significantly associated with susceptibility to the disease (*P* <0.001 and OR= 48.5, 95% CI= 10.88 to 216.26), while the homozygous C/C genotype at the same site was associated with disease resistance (*P* <0.001 and OR 0.04, 95% CI =0.01 to 0.13).

For the *TLR4* gene, the CC genotype at the 672 A>C site displayed a significant *P*-value (*P* = 0.01) and an OR lower than 1 (OR= 0.28, 95% CI =0.10 to 0.76), thus indicating a significant association with resistance to tuberculosis. Finally, in the *TLR9* gene, the analysis revealed one polymorphic site (2340 C>T) including one genotype (C/C) associated with resistance to the disease (*P* = 0.04 and OR= 0.33, 95% CI = 0.11 to 0.92).

Haplotype reconstruction based on *TLR2* polymorphisms performed by *PHASE* software, generated 25 possible haplotypes, 7 of which displayed a frequency greater than 0.01% in the whole sample (Table 18) . The software *PHASE* can reveal any significant imbalance in haplotype distribution between groups by performing a permutation test; the application of this analysis to the detected haplotypes revealed the presence of one haplotype (CTTACCAGCGGCCAGTCCC) associated with disease resistance (*P* = 0.04 and OR = 0.51, 95% CI= 0.27 to 0.96). In the haplotype are present a combination of the alleles of the 18 polymorphic sites of the *TLR2* gene, one of which was dinucleotidic (482/483 GC/CT). It is interesting to highlight that this haplotype contained the two allelic variations that resulted associated with disease resistance (381 A and 2064 C).

In the *TLR4* gene, 34 haplotypes were observed in the two groups tested, 6 of which displayed a frequency greater than 0.01% in the whole population. None of the predicted haplotypes showed a significant association with resistance/susceptibility to tuberculosis.

In the *TLR9* gene, the analysis revealed one polymorphic site (2340 C>T) including one genotype (C/C) associated with resistance to the disease (*P* = 0.04 and OR= 0.33, 95% CI = 0.11 to 0.92). In this gene, 4 haplotypes were observed in the two groups tested, but none of these haplotypes showed a significant association with resistance/susceptibility to tuberculosis.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

4.1 Gastrointestinal pathogens

The prevalence of *E. coli* and *Salmonella* spp. responsible for gastroenteritis in Mediterranean water buffalo calves is poorly investigated and characterized. However, epidemiologic studies of both bovine and water buffalo calves have implicated them as the major cause of neonatal diarrhoea (Fagiolo et al., 2005; Foster and Smith, 2009).

In the present study the prevalence of *E. coli* and *Salmonella* spp. in water buffalo calves affected by lethal gastroenteritis was assessed. Our study shows a prevalence of about 76% (188 out of 248) of *E. coli* in water buffalo calves. Unlike bovine calves, our study shows that in diarrheic water buffalo calves ETEC strains are infrequent. The differences between bovine and water buffalo ETEC strains also lie in the expressed virulence factors. Indeed, water buffalo ETEC strains exhibited a prevalence of the production of LT toxin, while ETEC strains of bovine origin have been shown to primarily produce ST toxin (Holland, 1990), even if ETEC with the genes for LT have been isolated also from cows, buffaloes and mithuns (Gyles and Fairbrother, 2010; Rajkhowa et al., 2009). Leomil and colleagues (2003) reported a frequency of STEC in bovine diarrheic and non-diarrhoic calves of 12.7%, among which the incidence of *eae* and haemolytic STEC was 18.2%. A recent study on buffaloes at slaughterhouse in Bangladesh reported a prevalence of STEC of 37.9%, mostly *eae*-positive (Islam et al., 2008). In Vietnam, a similar study showed that intimin-positive STEC strains could be recovered from 27% of rectal swabs from randomly selected buffaloes (Vu-Khach and Cornick, 2008). In Brazil Oliveira et al. (2007) described healthy water buffalo as an important reservoir of STEC, while in Italy adult water buffalo has been reported as a natural reservoir of the of STEC (Galiero et al., 2005). In the present study, *eae*-positive STEC were recovered from 6.8% of the *E. coli* isolates. The prevalence of *eae*-positive STEC mostly Stx1-positive observed in this study in water buffalo calves is consistent with data reported for diarrheic bovine calves where Stx1 is frequently associated with *eae*-positive strains and the *eae* gene is more frequently found in STEC from calves compared to STEC from adult cattle (Mainil et al., 1993; Sandhu et al., 1996).

CNF-producing *E. coli* have already been detected in association with both diarrheic and healthy bovine calves (Blanco et al., 1993; Burns et al., 1996; Orden et al., 1999, 2002; Van Bost et al., 2001), and our report shows high similarities between NTEC from bovine and water buffalo species. In fact, water buffalo NTEC frequency appeared comparable to those exhibited by NTEC recovered from both diarrheic (ranging from 8% to 23.3%) and healthy bovine calves (from 9.9% to 35.3%). All the collected water buffalo NTEC isolates also exhibited haemolytic activity, as elsewhere described for most NTEC of animal and human origin (Caprioli et al., 1989). Moreover, as for bovine NTEC, most NTEC from diarrheic water buffalo calves were CNF-positive, and exhibited a strong association between the virulence factors CNF and F17 (Mainil et al., 1999; Orden et al., 1999; Van Bost et al., 2001). Water buffalo NTEC also showed a strong association between CNF and CDT. The large presence of NTEC in diarrheic water buffalo calves and the number of expressed virulence factors highlight the pathogenic potential of this pathovar, which is stronger considering the possibility of exchanges between water buffalo and cattle. In fact, although most farms in the Campania region breed single species, either bovine or water buffalo, and animals are not grazed, there is still a high chance of

contagion as many farms still lack biosecurity requirements necessary to control the entry and the spread of diseases on the herd.

Multi-drug resistant *E. coli* have been isolated from many different species, including bovine, pigs and sheep (Enne et al., 2008; Lee, 2009). Resistance rates exhibited by the *E. coli* strains isolated from Mediterranean water buffalo calves included in this study appear alarmingly high, above all those observed for the newer molecules. The use of quinolones and fluoroquinolones in human medicine urged the European Commission to start a referral procedure for all veterinary medical products containing these classes of antimicrobials, aiming to promote their careful use in veterinary treatments (Directive 2001/82/EC; SANCO/6876/2009r6).

In addition this study reports a significant prevalence also of *Salmonella* spp. (20%) in diarrheic water buffalo calves, that are more relevant than those reported in previous studies (11 and 0.8%) (Adlakha & Sharma 1992; Amrousi et al. 1971). Moreover, in contrast with bovine species where salmonellosis results primarily associated with serovars Dublin and Typhimurium (Barrow et al. 2010), the extremely variable distribution of the observed serovars confirms the absence of a serovar specifically adapted to water buffalo, as previously suggested (Fagiolo et al. 2005). These data provide therefore evidence that *Salmonella*, particularly *S. Typhimurium*, can be potentially considered an important pathogen for this animal species. The definitive phage type 104 (DT104), which has often been associated with multiple-antibiotic-resistant strains with ascertained zoonotic potential and, in many countries, has increased over the past two decades (Barrow et al. 2010), does not seem to be widely spread in water buffalo.

The presence of more pathogens in the same subject might suggest that, as for other animal species (Barrow et al. 2010), diarrhea in water buffalo calves can be characterized by a multifactorial etiology. Data from necroscopic examinations of tissues indicated that the lesions caused by *S. Typhimurium* were characterized by severe damage of the intestine, ranging from congestive to necrotic-ulcerative enterocolitis. In particular, the strains isolated from animals exhibiting the most severe lesions were #16, #92, #233, and #83528. Among these strains, two belonging to the phage-type DT104 were also found, thus supporting the pathogenic role of this phage type. The other *Salmonella* serovars were instead isolated from subjects exhibiting a variety of different lesions, mostly minor lesions confined to the jejunum, associated with other pathogens. These data confirm the pathogenic potential of the serovar Typhimurium for water buffalo calves (tab. 6).

Our data confirm the high variability of the Typhimurium serovar (Mikasowa et al. 2005; Drahovska et al. 2007), mostly related to virulence factors, and highlight the high discriminating potential of the genotyping technique performed. The products of the genes included in the virulotyping assay performed here are known to be important during different stages of infection (Table 2). However, the distribution of these factors among the tested strains highlights the complexity and the variety of potential mechanisms used by *Salmonella* to induce disease in the host.

The *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, and *sopB* genes are genetic markers for the presence of the SPI 1-5 in all *S. Typhimurium* strains tested, although their presence does not necessarily implicate the presence of the entire SPI. SPIs are clusters of genes on the chromosome, likely to be horizontally acquired, and variably associated with enhanced invasion and intracellular survival within both phagocytic and non-phagocytic cells. In particular, SPI-5 has been largely associated with the ability to produce enteritis (Barrow et al. 2010). The *S. Typhimurium* strains included in this study all displayed the presence of the investigated SPI markers.

The *pefA* (plasmid encoded fimbria), *agfA* (aggregative fimbria A) and *spvC* (*Salmonella* plasmid of virulence gene C) genes are all located on plasmids (Higgins et al. 1997). Five *S. Typhimurium* isolates tested in the current study possessed both *pefA* and *spvC*, two isolates were positive for only *spvC*, and three isolates were positive for only *agfA* (Table 6). These results confirm the presence of more than one virulence plasmid among *S. Typhimurium* strains isolated from diarrheic water buffalo calves, and suggest horizontal exchange of virulence factors. Prophage genes are known to account for most of the variability of closely-related *S. Typhimurium* strains. Moreover, lysogenic bacteriophages promote changes in the composition of genomic DNA often altering the phenotype of the host (Mikasowa et al. 2005; Drahovska et al. 2007). The prophage virulence genes included in this study exhibited a variable distribution among the isolates tested, thus suggesting synergistic and/or redundant effects of these loci on the pathogenicity of *Salmonella*, likely contributing to the phenotypic variability of this pathogen. Fimbrial genes appeared widely distributed among all the serovars tested, with frequency values $\geq 92\%$, except for the plasmid - borne *pefA* and *agfA* genes (with frequency values of 38 and 54%, respectively). These data are consistent with the essential functions of adhesion factors for the attachment and internalization processes that occur during pathogenesis.

In conclusion, as for *E. Coli*, the results show that the most prevalent strains in diarrheic water buffalo calves were NTEC followed by *eae*-positive STEC and ETEC. The virulence factors associated with the NTEC strains were mostly CNF and haemolysin, with CNF exhibiting a strong association with CDT and with F17.

This study shows also a significant (25%) prevalence of *Salmonella* spp. in water buffalo calves affected by gastroenteritis with lethal outcome. However, our results did not indicate the existence of a *Salmonella* serovar specifically adapted to water buffalo and highlighted that *S. Typhimurium* is the most frequently found serovar. The molecular and phenotypic characterization of the *S. Typhimurium* isolates provided evidence that within this serovar there are different pathotypes potentially responsible for different clinical syndromes.

The reported results might therefore be useful for the development of effective prophylaxis and therapy protocols for the control of *E. coli* and *Salmonella* infections in water buffalo farms and possible contamination of the food chain. Prophylaxis is essential to prevent the occurrence of infectious diseases; in general, the upgraded health and welfare status, and the availability of specific vaccines, especially autogenous bacterins (custom bacterins), could result in a reduction of the use of antibiotics, and might, consequently, limit the emergence of antimicrobial resistances.

4.2 *Bubalus bubalis* toll-like receptor genes

The polymorphisms of single nucleotides constitute excellent genetic markers for various population studies, in that they can, for instance, reveal traces of natural selection. Moreover, it is now known that the contribution of genes to the incidence of or predisposition to diseases can be determined by comparing inter-individual genetic differences.

Each individual, to a greater or lesser degree than others, is genetically prone to develop certain diseases. In most cases, the susceptibility or resistance to a given pathology does not of course mean that the individual will necessarily be affected by the disease or remain disease-free; it does, however, indicate a higher or lower risk than that of the general population. Indeed, the onset of symptoms is due to an interaction between genetic factors and environmental factors (stress, diet, etc).

Nevertheless, cases have been described in which genetic factors are sufficient to determine the phenotype. In scrapie, for instance, which is a transmissible disease of sheep and goats caused by a prion, there are reports of genotypes that are defined as “resistant”, which are practically refractory to natural infection (Goldmann *et al.* 1994; Acutis *et al.* 2012).

Our analysis of the buffalo *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes enabled us to identify 29 new SNPs, none of which was previously reported. In the three genes, the 34% of the SNPs fell within the LRR protein domains, regions responsible for recognizing the ligand. This finding is in agreement with what has already been observed in *TLR* genes of cattle, humans and mice (Smirnova *et al.* 2000; Koets *et al.* 2010).

The case-control study carried out on the identified polymorphisms revealed the presence of associations between some of these and the onset of *M. bovis* infection. Specifically, in *TLR2*, we observed a strong correlation between susceptibility to disease and two SNPs, in particular with genotypes G/G at site 381 A>G and T/T at site 2064 T>C. By contrast, an equally strong correlation was seen between disease resistance and the A/G and C/C genotypes, when present at the same respective sites. Haplotype reconstruction enabled us to ascertain whether the interaction of the single alleles exerted an influence on the animal's response to the disease; indeed, this analysis revealed a haplotype that was associated with disease resistance (CTTACCAGCGGCCAGTCCC). This haplotype contained the two allelic variants which had already proved to be associated with disease resistance. However, as these variants are not exclusive of the associated haplotype, we may hypothesise that other loci/site exert a modulatory effect.

The study conducted on the polymorphisms identified in *TLR4* revealed the presence of a single genotype that was associated with disease resistance: the C/C genotype at site 672 A>C. In this case, haplotype reconstruction and the permutation test did not retrieve any disease-associated haplotype. Also in the *TLR9* gene, the analysis revealed only one polymorphic site (2340 C>T) including a single genotype (C/C) associated with resistance to the disease and the haplotype reconstruction with the permutation test did not retrieve any disease-associated haplotype.

One aspect that needs to be stressed is that all the SNPs for which the statistical analysis revealed an association with the disease were synonymous SNPs. The classical view was that synonymous mutations, also called silent mutations, had no effect on susceptibility to disease as they do not influence the amino acid composition of the encoded protein. However, in the early 1980s, several studies demonstrated that these mutations could also exert an effect on some of the most important processes that regulate protein synthesis, and therefore on the phenotype. To date, it is estimated that about 50 human diseases are caused entirely or partly by synonymous mutations, and it has also been demonstrated that they play a role in the resistance to some diseases (Sauna *et al.* 2007; Chamarye & Hurst 2009). In the human *TLR2*, for example, synonymous mutations have been identified which are associated with resistance to liver cell carcinoma (Juunjie *et al.* 2012).

With regard to the mechanisms in which these mutations are involved, a major step forward was the discovery that, in *Escherichia coli*, not all the synonymous codons were used at the same degree. Lipman & Wilbur observed that the action of certain codons could influence the speed, precision and levels of protein synthesis.

Moreover, it has been observed that silent mutations can interfere with various stages of protein “construction”, from DNA transcription to the translation of mRNA into protein. Silent changes in the codons that form part of the exonic splicing enhancers (ESE) can prevent the introns from being properly eliminated. A notable

example of the damage that can be caused by mutations in a splicing enhancer has been documented for the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene (Pagani *et al.* 2003, 2005).

Furthermore, even if the introns are correctly eliminated by the primary RNA transcript, the mRNA may not fold in the right way. In the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene, a silent mutation intensifies the folding of the mRNA, which becomes more difficult to unroll, thus reducing synthesis of the protein (Nackley *et al.* 2006).

Finally, synonymous mutations can alter the stability of the transcript by reducing its affinity for RNA binding proteins. Indeed, in humans, a synonymous mutation of the gene coding for corneodesmosine (*CDSN*) has been associated with the onset of psoriasis in various ethnic groups (Capon *et al.* 2004). Thus, it will be interesting to study these mutations in greater depth, for example by analysing the level of expression of the transcripts and the proteins by means of molecular techniques (e.g., real-time qPCR and Western-blot experiments), and then ascertaining whether different genotypes induce different levels of expression. Furthermore, mRNA stability assays could shed light on the functional role of the mutations identified (Duan *et al.* 2003).

An alternative hypothesis could be that some of the detected synonymous mutations are not directly related to disease susceptibility/resistance, but rather that they are linked to other functional mutations which have not yet been identified. A recent meta-analysis carried out in humans identified a significant association between an intron mutation of *TLR9* and tuberculosis (Kobayashi *et al.* 2012).

Further studies will be necessary in order to understand how these polymorphisms act. Studies of the genetic factors involved in complex diseases have not yet provided clear explanations for the onset of such diseases, though they can identify their underlying physiopathological pathways. A thorough knowledge of these mechanisms will form the basis of our ability to determine the risk of developing the disease and to understand it in its entirety.

These results may contribute to pave the way to create multiple layers of disease resistance in herds by selective breeding, to reduce the animal health control by slaughter and to identifying and synthesizing innovative drugs.

5 REFERENCES

5.1 Gastrointestinal pathogens

1. Adlakha S.C., Sharma S.N. (1992) Infectious diseases. In World Animal Science C6, Buffalo Productions. Edited by Tulloh NM, Holmes JHG. Parkville: Elsevier;:271-303.
2. Amrousi SE, Nefie EK, Rehewi ME, Mottilib AA: Studies on enteritis in buffalo calves. Assint J Egyptian Vet Med Ass 1971, 31:219-225.
3. Barrow PA, Jones MA, Thomson N: Salmonella In Pathogenesis of bacterial infections in animals. Edited by Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Ames: Blackwell Publishing; 2010:231-265.
4. Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E., Girardeau, J.P., 1996 Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 34, 2921-2928.
5. Beutin L., Montenegro M.A., Orskow L., Orskow F., Prada J., Zimmermann S., Stephan R. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strain of *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 27, 2559-2564.
6. Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Ramos, J., 1993 Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. American Journal of Veterinary Research 54, 1446-1451.
7. Burns, A.L., Ball, H.J., Finlay, D.A., 1996 CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. Veterinary Microbiology 49, 235-241.
8. Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F.M., Minelli, F., Orskov, I., Donelli, G., 1989 Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in haemolytic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 27, 758-761.
9. Chiu CH, Ou JT: Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol 1996, 34:2619-2622.
10. CLSI, 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd ed. Approved Standard. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010 Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology 8, 26-38.
12. Directive 2001/82/EC (OJ L311, 28.11.2001 p.1).

13. Drahovska H, Mikasova E, Szemes T, Ficek A, Sasik M, Majtan V, Turna J: Variability in occurrence of multiple prophage genes in *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Slovak Republic. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 270:237-244.
14. Enne, V.I., Cassar, C., Springings, K., Woodward, M.J., Bennett, P.M., 2008 A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiology Letters* 278, 193-199.
15. Fagiolo A, Roncoroni C, Lai O, Borghese A: Buffalo pathologies. In *Buffalo Production and Research*, Edited by Borghese A. Rome: FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research Network on Buffalo; 2005:249-296.
16. Foster, D.M., Smith, G.W., 2009 Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 25, 13-36.
17. Galiero, G., Conedera, G., Alfano, D., Caprioli, A., 2005 Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Veterinary Record* 156, 382-383.
18. Grimont PAD, Weill FX: *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, 9th edition. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; 2007:1-166.
19. Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. *Escherichia coli*. In: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., (Ed.s) Blackwell Publishing, Ames, pp. 267-308.
20. Higgins R, Désilets A, Cantin M, Messier S, Khakhria R, Ismaïl J, Mulvey MR, Daignault D, Caron H: Outbreak of *Salmonella* Give in the province of Quebec. *Can Vet J* 1997, 38:780–781.
21. Hopkins KL, Threlfall EJ: Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *J Med Microbiol* 2004, 53:539-543.
22. Holland, R.E., 1990 Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews* 3, 345-375.
23. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Litrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B: Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 2009, 7:523-535.
24. Lee, J.H., 2009 Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26 and O111 isolates from cattle and their characteristics. *Veterinary Microbiology* 135, 401-405.

25. Mainil, J.G., Jacquemin, E.R., Kaeckenbeeck, A.E., Pohl, P.H., 1993 Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1064-1068.
26. Mainil, J.G., Jacquemin, E., Pohl, P., Fairbrother, J.M., Ansuini, A., Le Bouguénec, C., Ball, H.J., De Rycke, J., Oswald, E., 1999 Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Veterinary Microbiology* 70, 123-135.
27. Mainil, J.G., Daube, G., 2005 Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* 98, 1332-1344.
28. Mikasova E, Drahovska H, Szemes T, Kuchta T, Karpiskova R, Sasik M, Turna J: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. *Vet Microbiol* 2005, 109:113-120.
29. Oliveira, M.G., Brito, J.R., Carvalho, R.R., Guth, B.E., Gomes, T.A., Vieira, M.A., Kato, M.A., Ramos, I.I., Vaz, T.M., Irino, K., 2007 Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5945-5948.
30. Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., de la Fuente, R., 1999 Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology* 66, 265-273.
31. Quinn PJ, Markey B, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ: *Veterinary microbiology and Microbial disease*, 2nd edition. West Sussex, UK: Wiley Blackwell, 2011:143-156.
32. SANCO/6876/2009r6 Staff Working paper of the services of the Commission on antimicrobial resistance.
33. Sandhu, K.S., Clarke, R.C., McFadden, K., Brouwer, A., Louie, M., Wilson, J., Lior, H., Gyles, C.L., 1996 Prevalence of the eaeA gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiology and Infection* 116, 1-7.
34. Toth, I., Héroult, F., Beutin, L., Oswald, E., 2003 Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4285-4291.
35. UNI EN ISO 6579:2002, Annex D "Detection of *Salmonella* spp. in animal feces and in environmental samples from primary production stage".
36. Van Bost, S., Bâbe, M.H., Jacquemin, E., Mainil, J., 2001 Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Veterinary Microbiology* 82, 311-320.

37. van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000 Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 327-335.
38. Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C., Vidal, R., 2005 Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5362-5365.
39. Vu-Khac, H., Cornick, N.A., 2008 Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Veterinary Microbiology* 126, 356-363.

5.2 Tuberculosis and role of TLR gene in the *Bubalus bubalis* innate immunity

1. Acutis P.L, Martucci F., D'Angelo A., Peletto S., Colussi S., Maurella C., Porcario C., Iulini B., Mazza M., Dell'Atti L., Zuccon F., Corona C., Martinelli N., Casalone C., Caramelli M., Lombardi G. (2012) Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene. *Veterinary Research* 43(1), 8.
2. Adams L.G., Templeton J.W., (1998) Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Revue Scientifique et Technique* 17(1), 200-219.
3. Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2, 675-680.
4. Akira S., Uematsu S. & Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
5. Amaral M.E., Grant J.R., Riggs P.K., Stafuzza N.B., Filho E.A., Goldammer T., Weikard R., Brunner R.M., Kochan K.J., Greco A.J., Jeong J., Cai Z., Lin G., Prasad A., Kumar S., Saradhi G.P., Mathew B., Kumar M.A., Miziara M.N., Mariani P., Caetano A.R., Galvão S.R., Tantia M.S., Vijh R.K., Mishra B., Kumar S.T., Pelai V.A., Santana A.M., Fornitano L.C., Jones B.C., Tonhati H., Moore S., Stothard P., Womack J.E. (2008) A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. *BMC Genomics* 9, 631.
6. Bellamy R. (1999) The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes and Infection* 1, 23-7.
7. Bishop S.C. & MacKenzie K.M. (2003) Genetic management strategies for controlling infectious diseases in livestock populations. *Genetics, Selection, Evolution* 35 (suppl.1), S3-17.
8. Capon F., Trembath R.C., Barker J.N., (2004) An update on the genetics of psoriasis. *Dermatologic Clinics* 22, 339–347.

9. Capparelli R., Alfano F., Amoroso M.G., Borriello G., Fenizia D., Bianco A., Roberto S., Roberto F., Iannelli D. (2007) Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity* 75(2), 988-96.
10. Chamary J.V., Hurst L.D. (2009) The price of silent mutations. *Scientific American* 300 (6), 46-53.
11. Coppola S., Parente E., Dumontet S., La Peccerella A. (1988) The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Le Lait* 68:295–310.
12. Duan J., Wainwright M.S., Comeron J.M., Saitou N., Sanders A.R., Gelernter J., Gejman P.V. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics* Feb 1;12(3):205-16.
13. Fritz J. H. & Girardin S. E. (2005) How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J. Endotoxin Res.* 11, 390–394 .
14. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J. (1994) PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *Journal of general virology* 75 (Pt 5): 989-95.
15. Griebel P.J., Brownlie R., Manuja A., Nichani A., Mookherjee N., Popowych Y., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L. A. (2005) Bovine toll-like receptor 9: A comparative analysis of molecular structure, function and expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108, 11-16.
16. Junjie X., Songyao J., Minmin S., Yanyan S., Baiyong S., Xiaxing D., Jiabin J., Xi Z., Hao C. (2012) The association between Toll-like receptor 2 single-nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility. *BMC Cancer* 12, 57.
17. Kobayashi K., Yuliwulandari R., Yanai H., Naka I., Lien L.T., Hang N.T.L., Hijikata M., Keicho N. and Tokunaga K. (2012) Association of *TLR* polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 79, 190–197.
18. Koets A., Santema W., Mertens H., Oostenrijk D., Keesstra M., Overdijk M., Labouriau R., Franken P., Frijters A., Nielen M., Rutten V. (2010) Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Preventative Veterinary Medicine* 93(4), 305-15.
19. Lemaitre, B. (2004) The road to Toll. *Nature Rev. Immunol.* 4, 521–527.

20. Lipman D.J., Wilbur W.J. (1984) Interaction of silent and replacement changes in eukaryotic coding sequences. *Journal of Molecular Evolution* 21(2),161-7.
21. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
22. Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 1: 135-145.
23. Mitra M., Taraphder S., Sonawane G.S., and Verma A. (2012) Nucleotide sequencing and SNP detection of Toll-like receptor-4 gene in Murrah Buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Scholarly Research Network*, vol 2012, 1-7 Art. ID 659513.
24. Mucha R., Bhide M.R., Chakurkar E.B., Novak M., Mikula I. (2009) Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 128:381-388.
25. Nackley A.G., Shabalina S.A., Tchivileva I.E., Satterfield K., Korchynskyi O., et al. (2006) Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure. *Science* 314,1930–1933.
26. OIE (World organization for animal health) (2013) Bovine tuberculosis. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.4.7. OIE 2013:
27. Pagani F., Buratti E., Stuani C., Baralle F.E. (2003) Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *Journal of Biological Chemistry* 278(29), 26580-26588.
28. Pagani F., Raponi M., Baralle F.E. (2005) Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(18), 6368–72.
29. Pinedo P.J., Buergelt C.D., Donovan G.A., Melendez P., Morel L., Wu R., Langae T.Y., Rae D.O. (2009) Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med* 91:189-196.
30. Pollock J.M., Neill S.D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veter. Journ.* 163(2): 115–127.
31. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Huffel C.V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 282: 2085-2088.

32. Quesniaux V., Fremond C., Jacobs M., Parida S., Nicolle D., Yeremeev V., Bihl F., Erard F., Botha T., Drennan M., Soler M.N., Le Bert M., Schnyder B., Ryffel B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and Infection* Aug 6(10): 946-59. Review.
33. Sauna Z.E., Kimchi-Sarfaty C., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. (2007) The sounds of silence: synonymous mutations affect function. *Pharmacogenomics* 8(6), 527-32.
34. Smirnova I., Poltorak A., Chan E.K., McBride C., Beutler B. (2000) Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biology* 1(1): research002.1-research002.10.
35. Stephens M., Smith N.J. and P. Donnelly (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.
36. Sun L., Song Y., Riaz H., Yang H., Hua G., Guo A., Yang L. (2012) Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 147:195-201.
37. Takeda K., Kaisho T. & Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.
38. Takeda K., Akira S. (2004) TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16: 3-9.
39. Takeuchi O., Akira S. (2001) TOLL-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology* 1, 625-635.
40. Trinchieri G., Sher A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence . *Nature Review Immunology* Mar;7(3):179-90. Review
41. Wei T., Gong J., Jamitzky F., Heckl W.M., Stark R.W., Rössle S.C. (2009) Homology modeling of human Toll-like receptors TLR7, 8, and 9 ligand-binding domains. *Protein Science* 18:1684-91.

FIGURES 9



Figure 1: Haemolysis of red blood cells caused by bacterial *hemolysins*.



Figure 2: River buffalo (*Bubalus bubalis*)

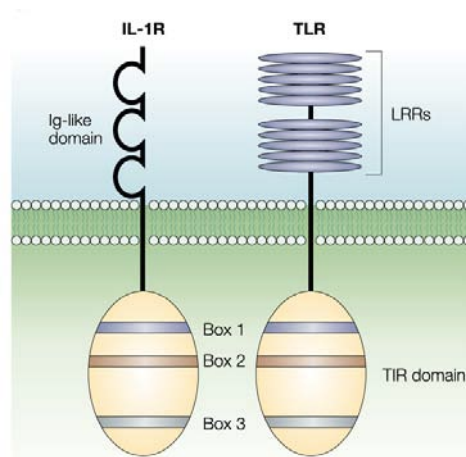
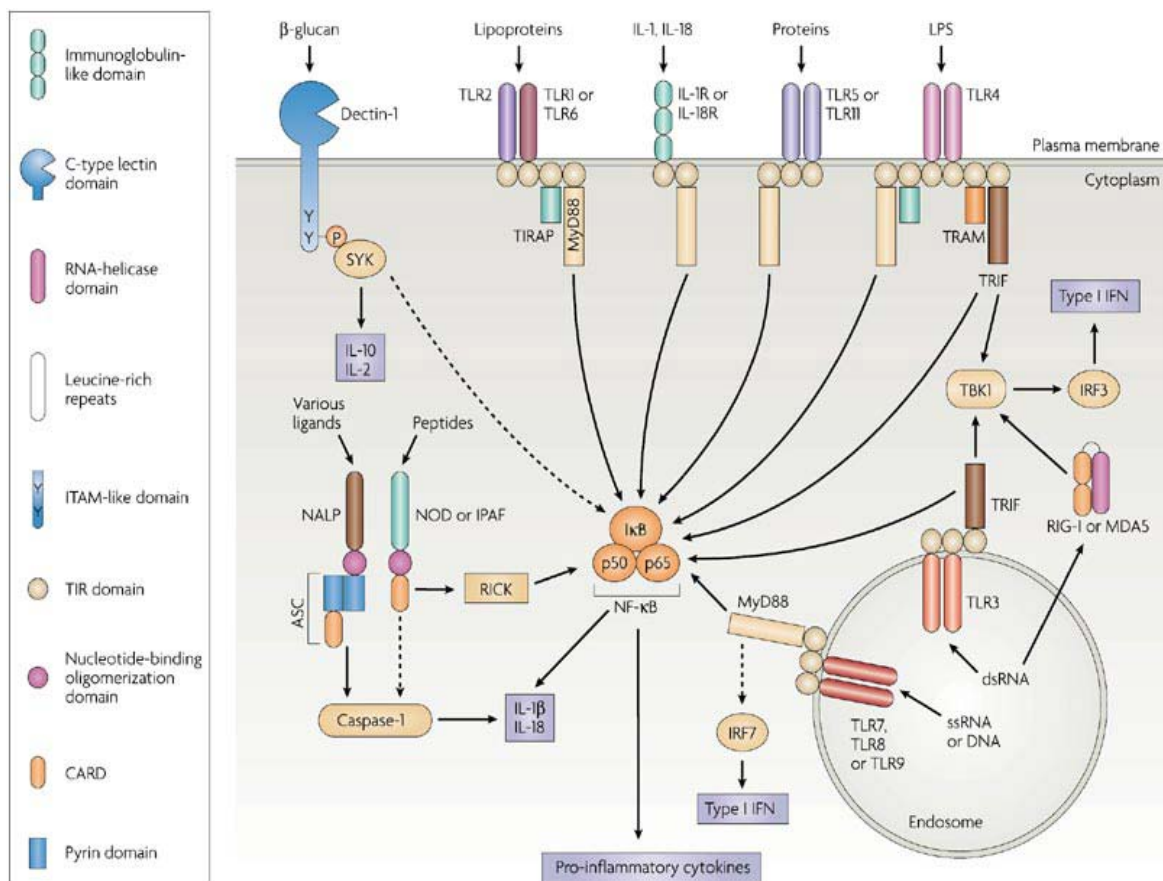


Figure 3: Structure of the IL-1R e TLR (Akira et al. *Nature Reviews Immunology* 4, 499- 511 (July 2004)).



Nature Reviews | Immunology

Figure 4: Schematic representation of the signal transduction mediated by TLRs (Trinchieri et al. *Nature Reviews Immunology* 7, 179-190 (March 2007)).

Bubalus bubalis Toll-like receptor 2 (TLR2) gene, complete cds

GenBank: HM756161.1

[GenBank FASTA](#)

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

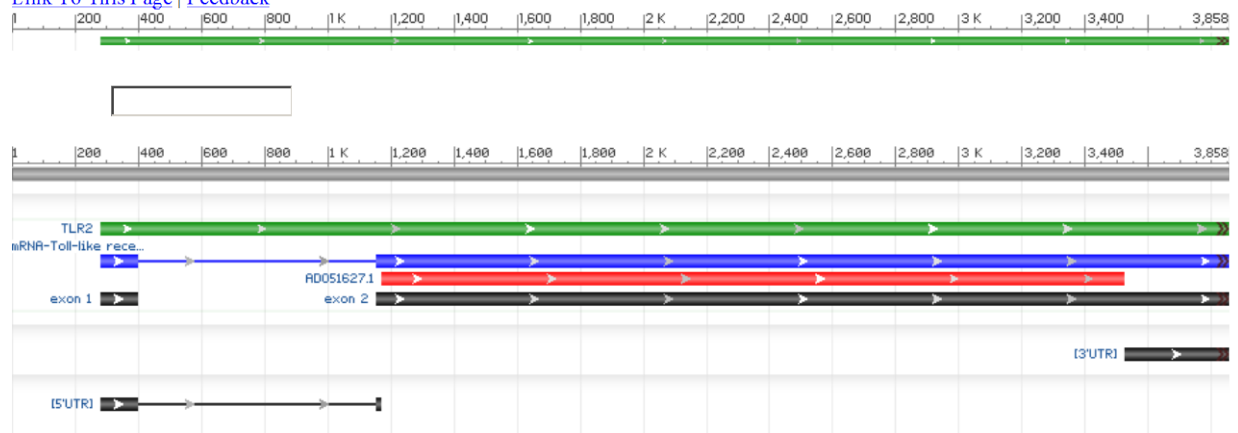


Figure 5: Schematic representation of the *TLR2* gene and his two exons (GenBank accession number HM756161).

Bubalus bubalis toll-like receptor 4 (TLR4) gene, complete cds

GenBank: JN786600.1

[GenBank FASTA](#)

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

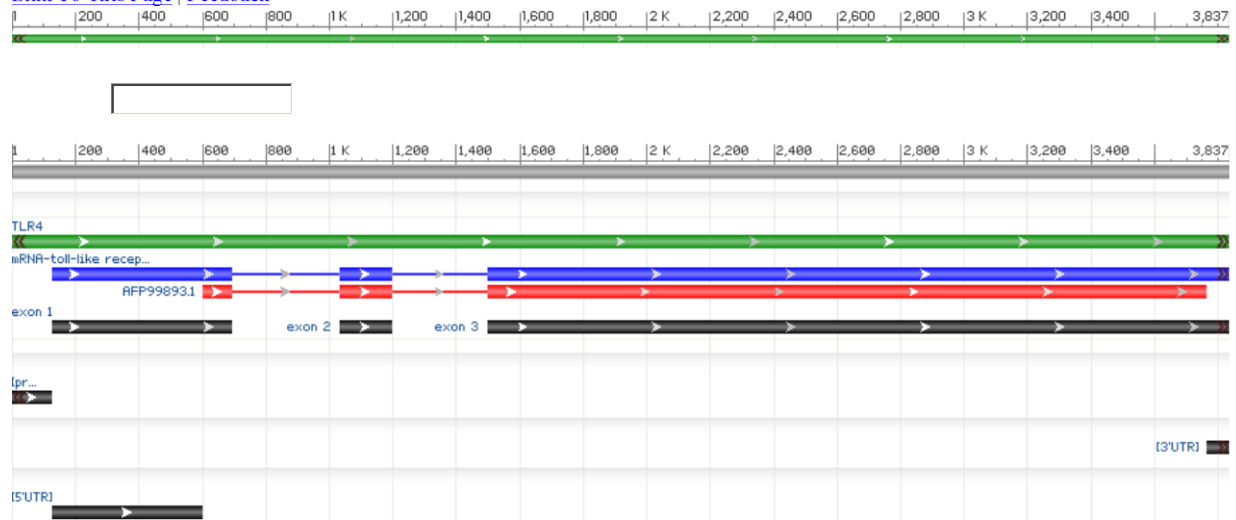


Figure 6: Schematic representation of the *TLR4* gene and his three exons (GenBank accession number JN786600).

Bubalus bubalis toll-like receptor 9 (TLR9) gene, complete cds

GenBank: HQ242778.1

[GenBank FASTA](#)

[Link To This Page](#) | [Feedback](#)

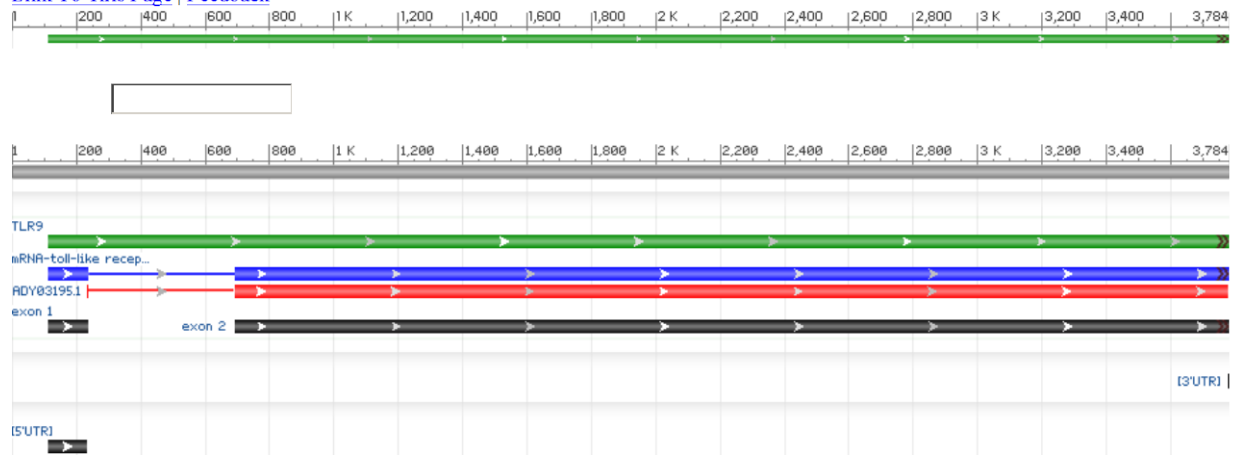


Figure 7: Schematic representation of the *TLR9* gene and his two exons (GenBank accession number H242778).

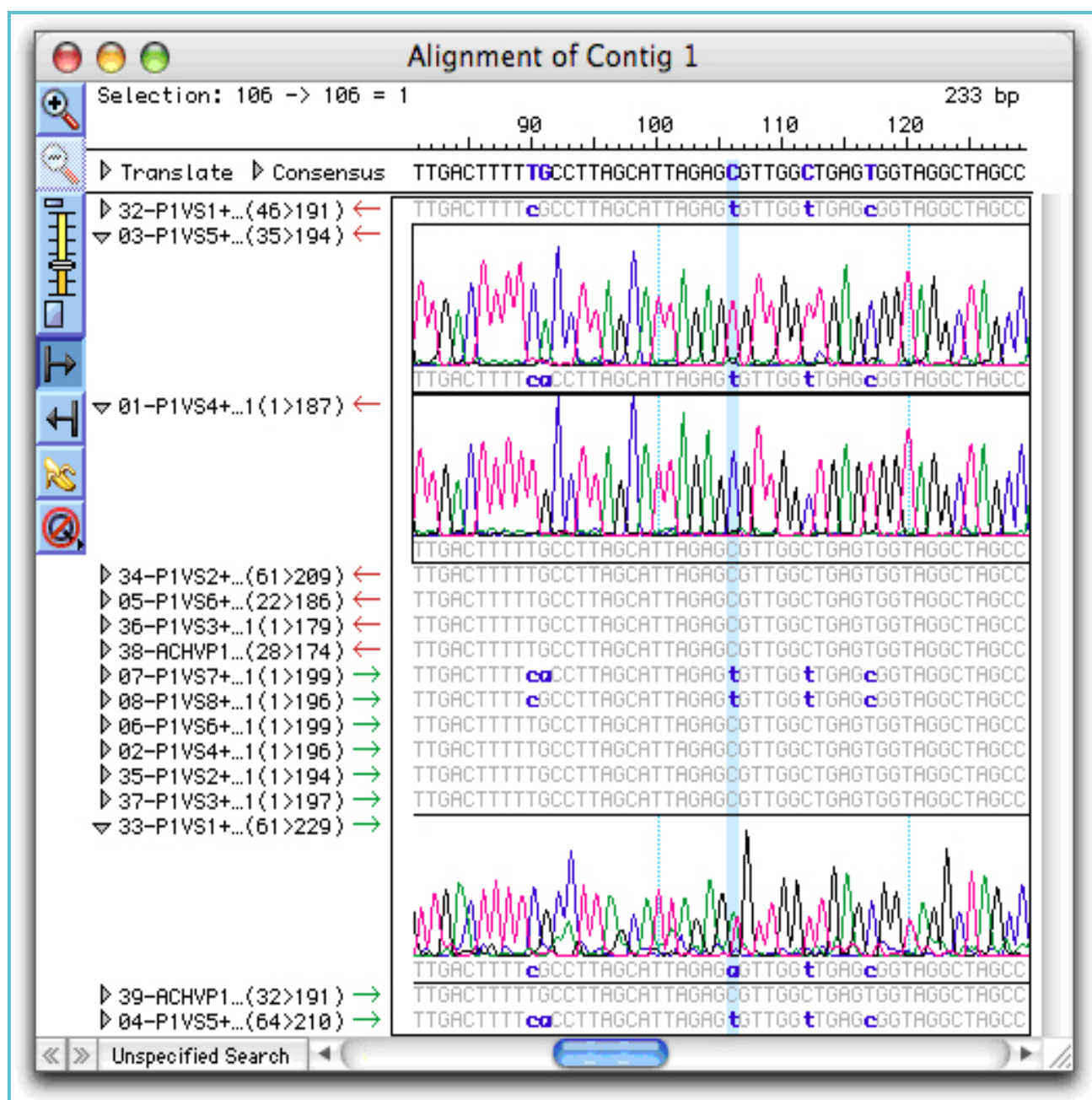


Figure 8: Alignment of sequences and generation of a consensus sequence using SeqManII 5.00 software (DNASTAR Inc.)

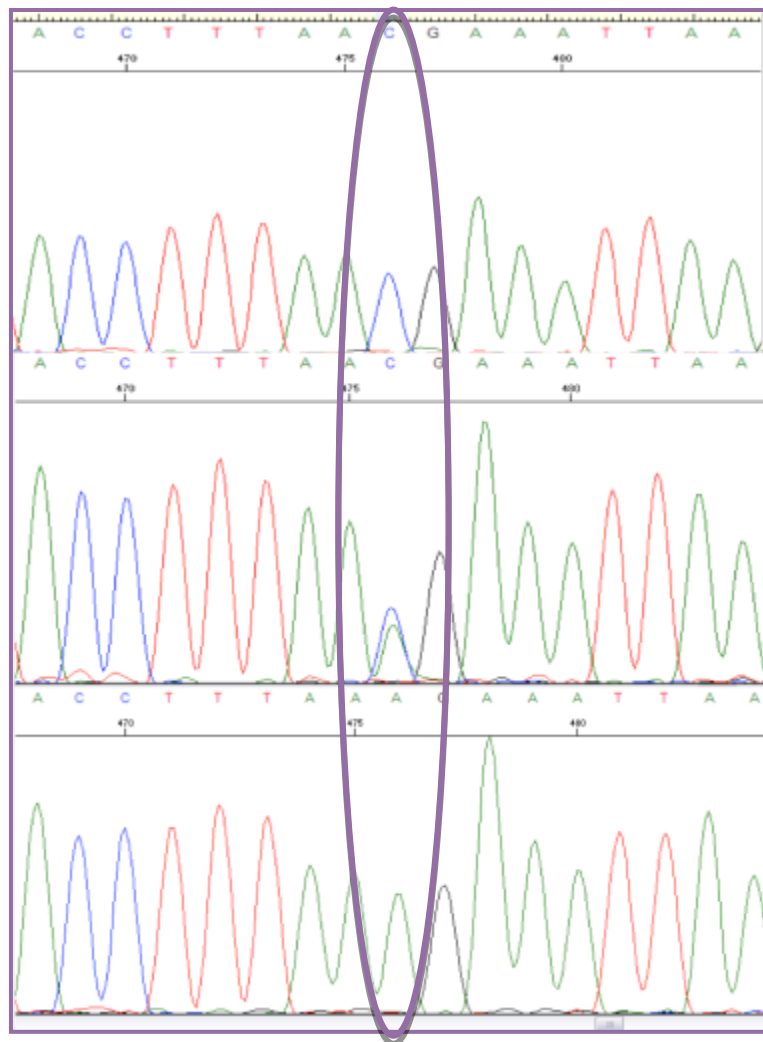


Figure 9: Alignment of three different sequences, in the picture are shown three different genotypes at the site 476, two homozygotes (C/C and A/A) and the heterozygote (C/A)

TABLES 18

Table 1: *Escherichia coli*, PCR primers and conditions used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')	Target gene	PCR product	Reference strains	Reference	PCR Conditions	
Stx1F Stx1R	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	<i>stx1</i>	348 bp	C210-03; ED 669	(Vidal et al., 2005)	35 x	90 s at 94°C 90 s at 60°C 90 s at 72°C
Stx2F Stx2R	ATCCTATTCCCGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	<i>stx2</i>	584 bp	C210-03	(Vidal et al., 2005)	35 x	90 s at 94°C 90 s at 60°C 90 s at 72°C
EaeF EaeR	TCAATGCAGTTCGGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	<i>eae</i>	482 bp	C210-03; ED 669	(Vidal et al., 2005)	35 x	90 s at 94°C 90 s at 60°C 90 s at 72°C
LtF LtR	GCACACGGAGCTCCTCAGTC TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	<i>ltlI</i>	218 bp	H10407	(Vidal et al., 2005)	35 x	90 s at 94°C 90 s at 60°C 90 s at 72°C
StF StR	AAAGGAGAGCTTCGTCACATTTT AATGTCCGTCCTTGCCTTAGGAC	<i>stII</i>	129 bp	EA-11	(Vidal et al., 2005)	35 x	90 s at 94°C 90 s at 60°C 90 s at 72°C
CnfF CnfR	GGGGGAAGTACAGAAGAATTA TTGCCGTCCACTCTCTCACCAGT	<i>cnf1</i>	1111 bp	EF-176	(Toth et al., 2003)	30 x	60 s at 94°C 60 s at 55°C 60 s at 72°C
CdtF CdtR	CAATAGTCGCCCACAGGA ATAATCAAGAACACCACCAC	<i>cdt-I</i>	411 bp	EF-133	(Toth et al., 2003)	30 x	60 s at 94°C 60 s at 55°C 60 s at 72°C
F17F F17R	GCTGGAAGGGTGCAATACGCCTG ATTCGTAACCCGCTCTCGTCC	<i>f17a</i>	321 bp	25KH9	(Bertin et al., 1996)	25 x	120 s at 94°C 60 s at 55°C 60 s at 72°C

Table 2 - *Salmonella* virulence genes detected by PCR analysis.

Gene	Function	Primer sequence (5' – 3')	bp	Reference
<i>avrA</i>	Inhibits the proinflammatory, antiapoptotic NF-kappa B pathway	CCTGTATTGTTGAGCGTCTGG AGAAGAGCTTCGTTGAATGTCC	422	8
<i>ssaQ</i>	Secretion system apparatus protein, component of second T3SS	AATGAGCTGGGTAGGGTGTG ATGCAACGCTAGCTGATGTG	216	This study
<i>mgtC</i>	Intramacrophage survival protein	TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	677	8
<i>siiD</i>	HLYD family secretion protein	GTTTCATGGTCAGGGCGTTAT GCAAGCAATGCGAGTTCCTT	416	This study
<i>sopB</i>	Translocated effector protein (phosphoinositide phosphatase) via T3SS	TAACGTCGAATGGCAAACCAA CCCTCATAAGCACTGGGAAA	334	This study
<i>gipA</i>	Peyer's patch-specific virulence factor	GCAAGCTGTACATGGCAAAG GGTATCGGTGACGAACAAAT	212	9
<i>gogB</i>	Type III-secreted substrate of the infection process	GCTCATCATGTTACCTCTAT AGTTTGGTATTTCCCATGCA	598	10
<i>sopE</i>	Translocated T3SS effector protein	CGAGTAAAGACCCCGCATAC GAGTCGGCATAGCACACTCA	363	10
<i>gtgB</i>	Translocated T3SS effector protein	TGCACGGGGAAAACTACTTC TGATGGGCTGAAACATCAAA	436	9
<i>sspH1</i>	<i>Salmonella</i> secreted protein H1	TGCAGAAAAAGGGGAATACG GCAGCCTGAAGGTCTGAAAC	246	This study
<i>sspH2</i>	<i>Salmonella</i> secreted protein H2	GCACAACCTGGCTGAAGATGA TTTCCCAGACGGAACATCTC	203	This study
<i>gtgE</i>	SPI2 type III secreted effector protein	AGGAGGAGTGTAAGGT GTAGAACTGGTTTATGAC	1114	11
<i>sodC1</i>	Periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases	TATTGTCGCTGGTAGCTG CAGGTTTATCGGAGTAAT	468	11
<i>spvC</i>	Spv region promotes rapid growth and survival within the host	ACTCCTTGACAACCAAATGCGGA TGCTTCTGCATTTGCCACCATCA	571	12
<i>invA</i>	Enables the bacteria to invade cells	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244	12
<i>stfE</i>	Minor fimbrial subunit of the <i>Salmonella</i> Typhi flagella	ATTTGGCAATGTGTTGACGA TTTGACAGCGGATACCCAAT	185	This study
<i>safC</i>	Pilin outer membrane usher protein	CTCGCTGTCATTGAACTGGA CACCGTGTGATGGTGAAGTC	158	This study
<i>csgA</i>	Major fimbrial subunit of thin curled fimbriae	GGATTCCACGTTGAGCATTT CGGAGTTTTTAGCGTTCCAC	212	This study
<i>ipfD</i>	The <i>Ipf</i> fimbrial operon mediates adhesion to Peyer's patches	TTCCCTCAATACGCAGGAAG CTCAGGGCTGTGAACTCTCC	183	This study
<i>bcfC</i>	Bovine colonization factor, fimbrial usher	CAGCTTTTCATGACGCGATA CAATGTCTCTGGTTGCGAGA	241	This study
<i>stbD</i>	Stability protein involved in a toxin-antitoxin system and in plasmid stability	GGCTGTAATATTCGCCGGTA GCACGCCCTATTCCAGTAAA	201	This study
<i>pefA</i>	Major fimbrial subunit of the plasmid encoded fimbria	ACACGCTGCCAATGAAGTGA ACTGCGAAAGATGCCACAGA	450	15
<i>fimA</i>	Type 1 major fimbrial unit	CCTTTCTCCATCGTCCTGAA TGGTGTATCTGCCTGACCA	85	This study
<i>agfA</i>	Aggregative fimbria A	GGATTCCACGTTGAGCATTT GTTGTTGCCAAAACCAACCT	312	15

Table 3: PCR primers and annealing temperatures for amplification of bubaline *TLRs 2, 4 and 9*.

Locus	Sequence (5' 3')	PCR T.A. (°C)
TLR2 a	Fw: TTTGTAGGTCAAATCACTGGACA Rw: TCCTGGCCACTGACAAGTTT	58*
TLR2 b	Fw: GCCCTTCCTTCAAACCTTG Rw: CACCACCAGACCAAGACTGA	58*
TLR4 a	Fw:GTGTGGAGACCTAGATGACTGG Rw:GTACGCTATCCGGAATTGTTCA	60
TLR4 b	Fw:CTTTCCTGGAGGGACTGTGC Rw:CCACGAAGTTTGAACCTAAGGTAA	60
TLR4 c	Fw:CTACCAAGCCTTCAGTATCTAG Rw:GGCATGTCCTCCATATCTAAAG	60
TLR4 d	Fw:AAGGACCAGAGGCAGCTCTT Rw:TAAGTGAACACGCCCTGCAT	58
TLR9 a	Fw:CCAGCCTCTCCTTAATCTCC Rw:CGGAACCAATCTTTCTCTAGTT	54
TLR9 b	Fw:CCTGACACCTTCAGTCACCT Rw:GCGGGTAAACATCTCTTGCT	55
TLR9 c	Fw:CGTCAGCTCAAAGGACTTCA Rw:AGGGTGTGCAGATGGTTCTC	56
TLR9 d	Fw:GGGAGACCTCTATCTCTGCTTT Rw:CGCTCACGTCTAGGATTTTC	56
TLR9 e	Fw:CTTCAGAAGCTGGACGTGAG Rw:TCTTGCGGCTGCTGTAGAC	55
TLR9 f	Fw:TGCTCTATGATGCCTTCGTG Rw:AGGTTGGCCCAGAACTACC	55

* For these primer pairs a touchdown PCR protocol was used.

Table 4: Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolates collected from diarrhoeic water buffalo calves.

Pathovars	Virulence factors	No. of isolates	Frequency (%)
ETEC	<i>lt</i>	3	1.6
	<i>st</i>	1	0.5
STEC	<i>stx1-eae</i>	4	2.1
	<i>stx1-eae-hly</i>	5	2.7
	<i>stx2-eae</i>	3	1.6
	<i>stx1-stx2-eae</i>	1	0.5
NTEC	<i>cnf-hly</i>	9	4.8
	<i>cnf-cdt-hly</i>	26	13.8
	<i>cnf-F17-hly</i>	1	0.5
	<i>cnf-cdt-F17-hly</i>	4	2.1
<i>E. coli</i>	-	131	69.8

Table 5: Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolates collected from diarrhoeic water buffalo calves.

%	Na	Amc	Amcl	Amp	Apr	Ct	Enr	Flu	Cn	My	Mafl	N	Ot	Pg	Sxt	Te
R	39	58	68	40	28	9	37	30	26	98	30	42	72	93	44	72
S	61	42	32	60	72	91	63	70	74	2	70	58	28	7	56	28
R = resistant; S = susceptible																

Antimicrobial molecules included in the study: nalidixic acid (Na), amoxicillin (Amc), amoxicillin/clavulanic acid (Amcl), ampicillin (Amp), apramycin (Apr), colistin (Ct), enrofloxacin (Enr), flumequine (Flu), gentamicin (Cn), lincomycin (My), marbofloxacin (Mafl), neomycin (N), oxytetracycline (Ot), penicillina (Pg), sulphamethoxazole/trimethoprim (Sxt), tetracycline (Te).

Table 6 - Virulotypes and phage types of the *Salmonella* Typhimurium isolates.

Isolate #	genes ^a											Genotype #	Phage type
	<i>gipA</i>	<i>gtgB</i>	<i>gogB</i>	<i>sspH</i> ₁	<i>sodC1</i>	<i>gtgE</i>	<i>spvC</i>	<i>safC</i>	<i>csgA</i>	<i>pefA</i>	<i>agfA</i>		
S. Typhimurium													
16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1	DT1
92	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	DT104
112	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	3	RDNC
148	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	4	DT194
233	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	5	DT104
279	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	5	U302
107025	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	6	RDNC
461	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	7	DT208
10606	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	10	U302
51789	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	8	DT110
55137	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	8	DT20
82280	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	9	DT110
83528	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	8	NT ^b
Freq. (%)	46	92	92	69	54	85	54	92	92	38	54		

^a The following *loci*: *invA*, *sspH2*, *stfE*, *ipfD*, *bcfC*, *stbD*, *fimA*, *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, *sopB* were present in all the strains; the *sopE* gene was not found in any of these strains.

^b NT = not typeable

Table 7: Multi- antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from diarrhoeic water buffalo calves.

Antibiotic-resistance profiles	No. of isolates	No. of isolates of <i>S.Typhimurium</i>
Na – Amp – Clo – Str – Sul – Te - Amcl	2	1
Clo – kan – Str – Sul – Te - Sxt	1	
Amp - Sul - Te - Sxt - Amcl -Cf	1	
Na - kan - Str - Te	1	
Str - Sul - Te -Sxt	1	
Amp – Sul - Te - Sxt	3	3
Amp - Str - Sul - Te	3	2*
Str - Sul - Te	2	1*
Less than 3 resistance/susceptibility	35	6
*It is included an isolated with fagotype DT104		

The *Salmonella* spp. isolates were assayed for susceptibility to the following 16 antimicrobials: nalidixic acid (Na), ampicillin (Amp), chloramphenicol (Clo), streptomycin (Str), sulfonamide (Sul), tetracycline (Te), amoxicillin/clavulanic acid (Amcl), kanamycin (kan), sulphamethoxazole/trimethoprim (Sxt), cephalotin (Cf), gentamicin (Cn), colistin sulphate (Ct), enrofloxacin (Enr), ceftazidime (Caz), cefotaxime (Cef), ciprofloxacin (Cip).

Table 8: Detected SNPs in bubaline *TLRs* 2, 4 and 9 genes and their locations in the protein domain architecture

gene	SNPs ^a	AA change ^b	Protein domain
<i>TLR2</i>	42 C>T	/	/
	53 C>T	M18T	/
	108 C>T	/	LRR 8
	153 G>A	/	/
	156 C>T	/	/
	374 T>C	A125V	LRR 8
	381 A>G	/	LRR 8
	482/483 GC>CT	S161T	LRR 8
	519 G>C	/	LRR 8
	1034 A>G	S345N	/
	1375 T>C	/	/
	1407 C>T	/	/
	1650 G>A	/	LRR CT
	1678 A>G	A560T	LRR CT
	1707 C>T	/	LRR CT
	1731 C>T	/	LRR CT
	1740 C>T	/	LRR CT
	2064 T>C	/	/
<i>TLR4</i>	572 A>C ^c	Y191S	/
	572 A>G ^c	/	/
	574 C>T	Q192W	/
	575 A>G	Q192W	/
	576 T>G	/	/
	577 G>A	E193K	/
	579 A>G	/	/
	647 G>A	/	/
	662 G>A	/	/
	672 A>C	/	/
<i>TLR9</i>	2340 C>T	/	/
	2475 A>G	/	/

^a SNPs positions were calculated taking the ATG start codon as position 1 based on the sequences GenBank:HM756161 (*TLR2* gene), GenBank:HM469969 (*TLR4* gene), GenBank:HQ242778 (*TLR9* gene)

^b amino acid positions are given according to the ATG start codon

^c This polymorphic site exhibits a SNP with three different alleles (572 A>CG)

Table 9 : Protein domain of *TLR2* non-synonymous SNPs.

SNPs	PROTEIN DOMAIN
53 T>C	Signal peptide
374 C>T	LRR5
482/483 GC/CT	LRR6
1034 G> A	LRR10
1678 G >A	extracellular

Table 10: Protein domain of *TLR4* non-synonymous SNPs.

SNPs	PROTEIN DOMAIN
572 A>C	LRR8
572 A>G	LRR8
574 C>T	LRR8
575 A>G	LRR8
577 G >A	LRR8

	Genotipo	controlli	freq. oss	freq. att	p	casi	freq. oss	freq.att	p
42-C>T	C/C	62	0,61	0,64	0,89	36	0,64	0,65	0,99
	T/T	2	0,02	0,04		2	0,04	0,04	
	C/T	37	0,37	0,32		18	0,32	0,32	
53-C>T	C/C	15	0,15	0,18	0,89	15	0,27	0,24	0,93
	T/T	30	0,30	0,33		15	0,27	0,24	
	C/T	56	0,55	0,49		25	0,45	0,48	
108-C>T	C/C	15	0,15	0,18	0,91	15	0,27	0,24	0,93
	T/T	31	0,31	0,34		15	0,27	0,24	
	C/T	55	0,54	0,49		25	0,45	0,48	
153-G>A	G/G	15	0,15	0,18	0,91	14	0,25	0,23	0,95
	A/A	31	0,31	0,34		15	0,27	0,25	
	G/A	55	0,54	0,49		26	0,46	0,48	
156-C>T	C/C	59	0,58	0,62	0,83	34	0,61	0,60	0,96
	T/T	1	0,01	0,05		2	0,04	0,04	
	C/T	41	0,41	0,34		19	0,34	0,32	
374-T>C	T/T	2	0,02	0,04	0,89	3	0,05	0,08	0,90
	C/C	61	0,60	0,63		27	0,48	0,50	
	T/C	38	0,38	0,33		25	0,45	0,39	
381-A>G	A/A	59	0,58	0,61	0,84	34	0,61	0,39	0,36
	G/G	1	0,01	0,04		19	0,34	0,13	
	A/G	40	0,40	0,33		2	0,04	0,45	
482/483-GC	GC/GC	60	0,59	0,63	0,84	33	0,59	0,59	0,95
	CT/CT	1	0,01	0,04		2	0,04	0,05	
	GC/CT	40	0,40	0,33		20	0,36	0,33	
519-G>C	G/G	53	0,52	0,57	0,88	28	0,50	0,52	0,95
	C/C	4	0,04	0,07		4	0,07	0,09	
	G/C	46	0,46	0,40		25	0,45	0,43	
1034-A>G	A/A	15	0,15	0,19	0,89	14	0,25	0,24	0,97
	G/G	31	0,31	0,35		15	0,27	0,26	
	A/G	57	0,56	0,51		27	0,48	0,50	
1375-T>C	T/T	4	0,04	0,05	0,95	3	0,05	0,08	0,91
	C/C	61	0,60	0,63		28	0,50	0,52	
	T/C	38	0,38	0,36		25	0,45	0,40	
1407-C>T	C/C	76	0,75	0,90	0,82	34	0,61	0,62	0,95
	T/T	1	0,01	0,04		2	0,04	0,05	
	C/T	40	0,40	0,40		20	0,36	0,34	
1650-G>A	G/G	53	0,52	0,53	0,99	38	0,68	0,70	0,85
	A/A	8	0,08	0,08		0	0,00	0,03	
	G/A	41	0,41	0,41		18	0,32	0,27	
1678-A>G	A/A	2	0,02	0,05	0,88	3	0,05	0,08	0,91
	G/G	61	0,60	0,64		28	0,50	0,52	
	A/G	39	0,39	0,34		25	0,45	0,40	
1707-C>T	C/C	15	0,15	0,18	0,90	14	0,25	0,24	0,97
	T/T	31	0,31	0,34		15	0,27	0,26	
	C/T	56	0,55	0,50		27	0,48	0,50	
1731-C>T	C/C	60	0,59	0,64	0,83	34	0,61	0,62	0,95
	T/T	1	0,01	0,05		2	0,04	0,05	
	C/T	41	0,41	0,34		20	0,36	0,34	
1740-C>T	C/C	60	0,59	0,64	0,83	35	0,63	0,63	0,97
	T/T	1	0,01	0,05		2	0,04	0,04	
	C/T	41	0,41	0,34		19	0,34	0,33	
2064-T>C	T/T	2	0,02	0,04	0,89	28	0,50	0,52	0,91
	C/C	60	0,59	0,60		3	0,05	0,08	
	T/C	37	0,37	0,32		25	0,45	0,40	

Table 11 (pag.56): Observed and expected frequencies of the different genotypes in the cases and controls groups at the polymorphic sites of the TLR2.

Table 12: Observed and expected frequencies of the different genotypes in the cases and controls groups at the polymorphic sites of the TLR4.

SNPs	Genotype	controls	obs. Freq.	exp. Freq.	p	cases	obs. Freq.	exp. Freq.	p
572 C>A G	A/A	27	0,218	0,03	0,56	6	0,05	0,03	0,56
	C/C	22	0,177	0,04		11	0,09	0,04	
	G/G	0	0,000	0,01		2	0,02	0,01	
	A/C	43	0,347	0,07		21	0,17	0,07	
	A/G	14	0,113	0,02		7	0,06	0,02	
	C/G	18	0,145	0,03		7	0,06	0,03	
574 C>T	C/C	92	0,742	0,66	0,89	37	0,69	0,66	0,89
	T/T	2	0,016	0,03		3	0,06	0,03	
	C/T	30	0,242	0,30		14	0,26	0,30	
575 A>G	A/A	83	0,669	0,74	0,88	41	0,76	0,74	0,88
	G/G	2	0,016	0,02		2	0,04	0,02	
	A/G	39	0,315	0,24		11	0,20	0,24	
576 T>G	G/G	26	0,210	0,13	0,87	5	0,09	0,13	0,87
	T/T	41	0,331	0,41		20	0,37	0,41	
	G/T	57	0,460	0,46		29	0,54	0,46	
577 G>A	A/A	24	0,194	0,21	0,91	10	0,19	0,21	0,91
	G/G	38	0,306	0,29		14	0,26	0,29	
	A/G	62	0,500	0,50		30	0,56	0,50	
579 A>G	A/A	42	0,339	0,27	0,97	14	0,26	0,27	0,97
	G/G	23	0,185	0,23		12	0,22	0,23	
	A/G	59	0,476	0,50		28	0,52	0,50	
647 G>A	A/A	26	0,210	0,14	0,91	6	0,11	0,14	0,91
	G/G	39	0,315	0,40		20	0,37	0,40	
	A/G	59	0,476	0,47		28	0,52	0,47	
662 G>A	A/A	27	0,218	0,13	0,87	5	0,09	0,13	0,87
	G/G	38	0,306	0,41		20	0,37	0,41	
	A/G	59	0,476	0,46		29	0,54	0,46	
672 A>C	A/A	34	0,274	0,41	0,87	20	0,37	0,41	0,87
	C/C	33	0,266	0,13		5	0,09	0,13	
	A/C	57	0,460	0,46		29	0,54	0,46	

Table 13: Observed and expected frequencies of the different genotypes in the cases and controls groups at the polymorphic sites of the TLR9.

	Genotype	controls	obs. freq.	exp. freq.	P	cases	obs. freq.	exp. freq.	P
2340 C>T	C/C	16	0,22	0,19	0,61	4	0,08	0,10	0,63
	T/T	26	0,36	0,24		23	0,44	0,39	
	C/T	31	0,42	0,22		25	0,48	0,25	
2475 A>G	A/A	19	0,41	0,41	0,49	19	0,46	0,50	0,49
	G/G	6	0,13	0,40		2	0,05	0,30	
	A/G	21	0,46	0,21		20	0,49	0,24	

Table 14: Frequency distribution of the different genotype for each SNP in the TLR2.

gene	SNPs	genotype	p value	O.R.	I.C 95%
<i>TLR 2</i>	42 C>T	C/C	0,84	1,13	0,57 - 2,29
		T/T	0,61	1,83	0,25 - 13,38
		C/T	0,69	0,81	0,41 - 1,63
	53 C>T	C/C	0,08	2,15	0,96 - 4,82
		T/T	0,85	0,89	0,43 - 1,84
		C/T	0,20	0,67	0,35 - 1,30
	108 C>T	C/C	0,09	2,15	0,96 - 4,82
		T/T	0,79	0,85	0,41 - 1,75
		C/T	0,36	0,7	0,36 - 1,35
	153 G>A	G/G	0,15	1,96	0,86 - 4,4
		A/A	0,79	0,85	0,41 - 1,75
		G/A	0,48	0,75	0,39 - 1,45
	156 C>T	C/C	0,80	1,15	0,59 - 2,26
		T/T	0,55	3,77	0,33 - 42,59
		C/T	0,57	0,77	0,39 - 1,53
	374 T>C	T/T	0,34	2,86	0,46 - 17,63
		C/C	0,18	0,63	0,33 - 1,23
		T/C	0,39	1,38	0,71 - 2,69
	381 A>G	A/A	0,86	1,13	0,57 - 2,21
		G/G	0,00	52,25	6,75 - 404,57
		A/G	0,00	0,06	0,01 - 0,25
	482/483 GC>CT	GC/GC	1,00	1,03	0,52 - 2,00
		CT/CT	0,28	3,77	0,33 - 42,59
		GC/CT	0,73	0,87	0,44 - 1,72
	519 G>C	G/G	0,92	0,91	0,48 - 1,74
		C/C	0,45	1,87	0,45 - 7,77
		G/C	1,00	0,97	0,50 - 1,86
	1034 A>G	A/A	0,13	1,96	0,86 - 4,42
		G/G	0,71	0,85	0,41 - 1,86
		A/G	0,41	0,75	0,39 - 1,44
	1375 T>C	T/T	0,69	1,4	0,30 - 6,49
		C/C	0,34	0,69	0,36 - 1,33
		T/C	0,43	1,38	0,71 - 2,67
	1407 C>T	C/C	0,74	0,84	0,43 - 1,65
		T/T	0,55	3,74	0,33 - 42,20
		C/T	1,00	1,06	0,54 - 2,10
	1650 G>A	G/G	0,07	1,95	0,99 - 3,86
		A/A	0,10	0,1	0,01 - 1,74
		G/A	0,40	0,7	0,35 - 1,40
	1678 A>G	A/A	0,34	2,83	0,46 - 17,47
		G/G	0,24	0,67	0,35 - 1,30
		A/G	0,49	1,3	0,67 - 2,52
	1707 C>T	C/C	0,16	1,93	0,85 - 4,37
		T/T	0,76	0,84	0,4 - 1,73
		C/T	0,52	0,76	0,40 - 1,47
	1731 C>T	C/C	1,00	1,08	0,56 - 2,10
		T/T	0,55	3,74	0,33 - 42,20
		C/T	0,55	3,74	0,33 - 42,20
	1740 C>T	C/C	0,77	1,17	0,60 - 2,28
		T/T	0,55	3,74	0,33 - 42,20
		C/T	0,54	0,76	0,38 - 1,50
	2064 T>C	T/T	0,00	48,5	10,88 - 216, 26
		C/C	0,00	0,04	0,01 - 0,13
		T/C	0,47	1,35	0,69 - 2,63

Table 15: Frequency distribution of the different genotype for each SNP in the TLR4.

gene	SNPs	genotype	<i>p value</i>	O.R.	I.C 95%
<i>TLR 4</i>	572 C>A G	A/A	0,16	0,46	0,18 - 1,16
		C/C	0,8	1,17	0,53 - 2,58
		G/G	0,09	11,6	0,54 - 245
		A/C	0,76	1,16	0,60 - 2,22
		A/G	0,88	1,17	0,45 - 3,01
		C/G	1	0,88	0,35 - 2,21
	574 C>T	C/C	0,54	0,75	0,37 - 1,52
		T/T	0,32	3,58	0,58 - 22,12
		C/T	1	1,09	0,52 - 2,28
	575 A>G	A/A	0,3	1,55	0,75 - 3,22
		G/G	0,58	2,34	0,32 - 17,10
		A/G	0,18	0,55	0,25 - 2,19
	576 T>G	G/G	0,09	0,38	0,13 - 1,06
		T/T	0,72	1,19	0,61 - 1,32
		G/T	0,43	1,36	0,71 - 2,58
	577 G>A	A/A	0,92	0,94	0,41 - 2,14
		G/G	0,64	0,79	0,38 - 1,62
		A/G	0,6	1,25	0,65 - 2,37
	579 A>G	A/A	0,38	0,68	0,33 - 1,39
		G/G	0,71	1,25	0,57 - 2,75
		A/G	0,71	1,18	0,62 - 2,24
	647 G>A	A/A	0,17	0,47	0,18 - 1,22
		G/G	0,57	1,28	0,65 - 2,50
		A/G	0,71	1,18	0,62 - 2,24
	662 G>A	A/A	0,07	0,36	0,13 - 1,01
		G/G	0,5	1,33	0,68 - 2,60
		A/G	0,55	1,27	0,67 - 2,42
	672 A>C	A/A	0,26	1,55	0,78 - 3,06
		C/C	0,01	0,28	0,10 - 0,76
		A/C	0,43	1,36	0,71 - 2,58

Table 16: Frequency distribution of the different genotype for each SNP in the TLR4.

gene	SNPs	genotype	<i>p value</i>	O.R.	I.C 95%
<i>TLR 9</i>	2340 C>T	C/C	0,04	0,33	0,11 - 0,92
		T/T	0,29	1,43	0,72 - 2,85
		C/T	0,59	1,27	0,64 - 2,47
	2475 A>G	A/A	0,57	1,29	0,65 - 2,56
		G/G	0,08	0,36	0,12 - 1,02
		A/G	0,53	1,31	0,66 - 2,59

Table 17: Polymorphic sites including genotypes with statistically significant *P*-values and ORs

gene	SNPs	genotype	<i>P</i>-value	OR	CI 95%
<i>TLR2</i>	381 A>G	A/A	0.86	1.13	0.57 - 2.21
		G/G	0.00	52.25	6.75 - 404.57
		A/G	0.00	0.06	0.01 - 0.25
	2064 T>C	T/T	0.00	48.5	10.88 - 216. 26
		C/C	0.00	0.04	0.01 - 0.13
		T/C	0.47	1.35	0.69 - 2.63
<i>TLR4</i>	672 A>C	A/A	0.26	1.55	0.78 - 3.06
		C/C	0.01	0.28	0.10 - 0.76
		A/C	0.43	1.36	0.71- 2.58
<i>TLR9</i>	2340 C>T	C/C	0.04	0.33	0.11 - 0.92
		T/T	0.29	1.43	0.72 - 2.85
		C/T	0.59	1.27	0.64 - 2.47

Bold lines highlight genotypes with statistically significant differences in frequency distribution between cases and controls

Table 18: Haplotype reconstruction based on *TLR2* polymorphisms performed by *PHASE* software. Seven haplotypes with a frequency greather than 0.01%.in the whole sample.

Haplotypes	Frequency controls	Frequency cases	n° controls	n° cases	<i>p-value</i>	O.R	I.C 95%
CCCGCTAGCGATCGACCCT	0,206	0,245	21	14	0,48	1,24	0,72 ÷ 2,15
CCCGTCGCTGACTGGCTTC	0,015	0,027	2	2	0,67	1,86	0,37 ÷ 9,38
CTTACCAGCGGCCGGTCCC	0,035	0,063	4	4	0,26	1,9	0,65 ÷ 5,55
CTTACCAGCGGCCAGTCCC	0,234	0,134	24	7	0,04	0,51	0,27 ÷ 0,96
CTTACCAGCCGCCAGTCCC	0,020	0,027	2	2	0,7	1,39	0,31 ÷ 6,32
CTTACCAGCCGCCGGTCCC	0,257	0,263	26	15	0,89	1,06	0,63 ÷ 1,78
TCCGTCGCTGACTGGCTTC	0,189	0,161	19	9	0,55	0,82	0,44 ÷ 1,51

Pubblicazioni

1. LUCIBELLI M. G., AURIEMMA C., GALLO A., ALFANO F., BORRIELLO G., GUARINO A., ZICARELLI G., GALIERO G. (2011). "Indagine sulla presenza di Coxiella Burnetii in feti bovini e bufalini nella regione campania.". *Buiatria Journal of the Italian Association for Buiatrics* vol.6 n. 1.2011: 27-30.
2. LUCIBELLI M. G., AURIEMMA C., BORRIELLO G., ALFANO F., GALLO A., DE CARLO E., GALIERO G. (2011). "Indagine sulla presenza di Coxiella Burnetii in feti bovini e bufalini nella regione campania.". *Atti del XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, Trani 12-14 ottobre.
3. DE CARLO E., MARTUCCIELLO A., ALFANO D., LUCIBELLI M. G., ALFANO F., GALLO A., GUARINO A., GALIERO G. (2011). "Bacteriological survey from aborted fetuses of mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy". *Atti del VI Simposio de Bufalòs de las Américas y VI Simposio de Europa y America*, La Habana, Cuba, 21-26 novembre.
4. BORRIELLO G., LUCIBELLI M. G., AURIEMMA C., ALFANO F., LUONGO L., RICCONI N., NAPPI R., GALIERO G., GUARINO A. (2012). "Caratterizzazione molecolare e fenotipica di ceppi di Escherichia coli (ETEC, STEC e NTEC) isolati da vitelli bufalini affetti da gastroenterite.". *Atti del VIII Workshop Nazionale – Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche ENTER-NET Italia "Infezioni trasmesse da alimenti e acqua: diagnostica ed epidemiologia"*, Vietri sul Mare (Salerno) 31 maggio-01 giugno.
5. AURIEMMA C., LUCIBELLI M. G., ALFANO F., BORRIELLO G., DEL PIANO F., RAGOSTA C., FRANCESE A., D'AMORE M., GUARINO A., GALIERO G. (2012). "Molecular detection of Neospora caninum in fetal tissues from spontaneous buffalo abortions" *Atti del XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SolPa)*, Alghero 26-29 giugno.
6. BORRIELLO G., LUCIBELLI M.G., AURIEMMA C., ALFANO F., GALLO A., BOVE F., BUONANNO M.L., CERRONE A., RICCONI N., GUARINO A., GALIERO G. (2012). "Le gastroenteriti infettive del vitello bufalino: identificazione e caratterizzazione dei principali agenti eziologici in allevamenti campani". *Large Animal Review*, 18: 291-296.
7. ALFANO F., PELETTO S., LUCIBELLI M. G., BORRIELLO G., URCIUOLO G., MANIACI M. G., TARANTINO M., BARONE A., PASQUALI P., ACUTIS P.L., GALIERO G. (2014) "Identification of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor candidate genes associated with tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*)". (*submitted*)

Comunicazioni

1. ALFANO F., PELETTO S., LUCIBELLI M. G., BORRIELLO G., TARANTINO M., PASQUALI P., GUARINO A., ACUTIS P.L., GALIERO G. (2012). "L'immunità innata nella bufala mediterranea: studio sul ruolo dei recettori Toll-like 2, 4 e 9 nei confronti di *Micobacterium bovis*". *Atti del XIV Congresso Nazionale della Società*

Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinario (S.I.Di.L.V.). Sorrento (NA) 24 - 26 ottobre .

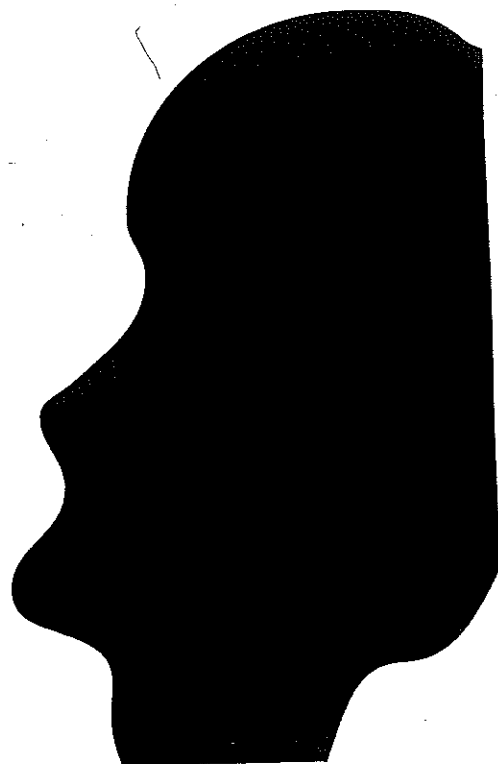
BUIATRIA



Journal of the Italian Association for Buiatrics

SIB *Società Italiana di Buiatria*
vol. 6 - n. 1.2011

ISSN 1828-4078



INDAGINE SULLA PRESENZA DI *Coxiella Burnetii* IN FETI BOVINI E BUFALINI NELLA REGIONE CAMPANIA

Lucibelli M.G. (*), Auriemma C. (*), Gallo A. (*), Alfano F. (*), Borriello G. (*), Guarino A. (*), Zicarelli G. (**), Galiero G. (*)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (*)
Veterinario libero professionista (**)

Riassunto

La febbre Q è una zoonosi ampiamente diffusa causata da *C. burnetii*. Questo patogeno Gram-negativo intracellulare obbligato può infettare un ampio numero di specie animali, e i ruminanti domestici sono considerati la più importante fonte di infezione per l'uomo. La principale modalità di trasmissione è rappresentata dall'inalazione di aerosol infetto. Negli animali l'infezione da *C. burnetii* è generalmente asintomatica, anche se gli animali infetti possono eliminare questo patogeno in modo intermittente attraverso feci, urine, latte e lochiazioni. I principali sintomi clinici eventualmente riscontrabili negli allevamenti sono rappresentati da disordini riproduttivi, quali aborti, parti prematuri e ipofertilità. La ricerca di *C. burnetii* in feti bovini e bufalini (*Bubalus bubalis*) provenienti da allevamenti della regione Campania ha evidenziato una presenza del 18% e del 49%, rispettivamente, a meno di altri agenti eziologici. Questi risultati indicano che la febbre Q è una malattia molto diffusa e altrettanto sottostimata negli allevamenti bovini e bufalini, ed è pertanto necessario effettuare degli opportuni piani di monitoraggio che potrebbero costituire la base per la pianificazione di attività di controllo e profilassi mirate a contenere l'impatto economico e sanitario della febbre Q in Campania.

Parole chiave: *C. burnetii*, bovini, bufali, PCR.

Summary

Detection of Coxiella burnetii in bovine and water buffalo fetuses in the Campania region

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *C. burnetii*. This obligate intracellular Gram-negative pathogen can infect a wide range of animal species, with domestic ruminants as the main reservoirs of infection and source of contamination for humans. The primary route of transmission consists of inhalation of contaminated aerosols. In contrast in animals *C. burnetii* infection is generally asymptomatic, even if infected animals can shed intermittently this pathogen in faeces, urine, milk and birth products. Clinical symptoms eventually occurring in ruminant herds are mainly represented by reproductive disorders, such as premature birth, dead or weak offspring and infertility. The detection of *C. burnetii* in bovine and water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses collected from farms located in the Campania region showed a presence of 18% and 49%, respectively, in subjects negative to other aetiological agents. These results indicate that Q fever is a widespread disease and underestimated as well in bovine and water buffalo herds, and proper monitoring plans would be necessary to set control and prophylaxis activities aiming to limit the economical and health impact of Q fever in the Campania region.

Key words: *C. burnetii*, bovine, water buffalo, PCR.

Introduzione

La febbre Q è una zoonosi causata da *Coxiella burnetii*, un batterio intracellulare diffuso in tutto il mondo e a lungo ignorata. *C. burnetii* può infettare una grande varietà di animali, tra cui ruminanti, cani, gatti, primati, roditori selvatici, rettili, anfibi, uccelli, pesci e zecche (Maurin e Raoult, 1999, Angelakis e Raoult, 2010). Tra i ruminanti domestici, bovini, ovini e caprini sono i principali reservoir di infezione e sono quindi tra le principali fonti di infezione per l'uomo. Le modalità di contagio da *C. burnetii* sono svariate, e quella principale per l'uomo è costituita dall'inalazione di particelle infette. La trasmissione del batterio attraverso aerosol contaminati può avvenire mediante contatto diretto con animali infetti, o, in modo particolare, con i prodotti del parto, quali liquido amniotico e placenta. L'estrema resistenza di questo patogeno agli agenti esterni lo rende persistente nell'ambiente (Borriello et al., 2010). Le zecche non sono in grado di trasmettere l'infezione all'uomo, ma possono trasmetterla agli animali domestici, contribuendo così al mantenimento dell'agente infettivo nell'ambiente (Kazar, 1996). Gli animali sono spesso cronicamente infetti, ma quasi sempre asintomatici. Durante la fase acuta *C. burnetii* può essere ritrovata nel sangue, nei polmoni, nella milza e nel fegato. Nelle femmine bovine *C. burnetii* si localizza nell'utero e nelle ghiandole mammarie e può essere eliminata attraverso il latte, le feci e le urine. L'eliminazione del microrganismo attraverso queste vie può persistere per parecchi mesi, anche per i soggetti che non hanno presentato problemi al momento del parto (Berri et al., 2005).

La febbre Q è endemica nei ruminanti domestici nella maggior parte, se non tutti, i paesi europei (EFSA, 2010). Anche nell'uomo l'infezione è presente in tutti gli stati membri dell'UE e, in alcune circostanze epidemiologiche, gli effetti sulla salute pubblica possono essere significativi. Sebbene l'infezione sia comune, la malattia è rara ed, essendo spesso asintomatica, non viene sempre diagnosticata. Di conseguenza i dati disponibili spesso sottostimano le dimensioni del fenomeno.

Al fine di verificare la presenza di *C. burnetii* negli allevamenti bovini e bufalini della regione Campania sono state condotte specifiche indagini su feti abortiti che possono essere ritenuti un'ottima fonte di preziose informazioni epidemiologiche a tal riguardo.

Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

Tutti i feti bufalini e bovini conferiti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno nel biennio 2009-2010 risultati negativi alla detection di *Brucella* spp., *Chlamydomphila* spp., *Leptospira* spp., Bubaline Herpesvirus 1, *Neospora caninum*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Toxoplasma* spp. sono stati sottoposti alla detection di *C. burnetii* mediante PCR convenzionale (Perugini et al., 2009). Sono stati analizzati 22 feti bovini provenienti da 22 allevamenti diversi e 35 feti bufalini provenienti da 32 allevamenti diversi, tutti ubicati nella

regione Campania. Da ogni soggetto sono stati prelevati il contenuto del quarto stomaco, i polmoni, il fegato e, quando disponibile, anche la placenta.

Estrazione del DNA e single tube nested-PCR

Il DNA genomico totale è stato estratto dai tessuti congelati mediante l'utilizzo del QIAamp DNA mini kit (Qiagen) secondo le istruzioni riportate dal produttore. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante assorbimento di raggi UV (Sambrook et al., 1989). La reazione di polimerizzazione è stata condotta come indicato da Parisi e colleghi (2006) e includeva 0.5 μ M di ogni primer interno, 0.005 μ M di ogni primer esterno, 1 μ l di ACGU + T dNTP Mix (SIGMA), 0.5 unità di UDG (SIGMA), 1U di Taq DNA polimerasi (Eppendorf) e 1X Taq buffer (Eppendorf). I prodotti di PCR sono stati visualizzati dopo elettroforesi su gel di agarosio 2% (p/v) e colorazione con bromuro di etidio.

Risultati.

L'indagine è stata condotta in 22 feti bovini e 35 feti bufalini mediante prelievo e detection di *C. burnetii* tramite PCR in polmoni, fegato, contenuto del quarto stomaco e, se disponibile, placenta di ogni soggetto conferito. I feti sono stati ritenuti positivi quando almeno uno degli organi campionati è risultato positivo. I risultati ottenuti hanno mostrato che il 18% (4/22) dei feti bovini e il 49% (17/35) dei feti bufalini testati hanno dato esito positivo alla ricerca di *C. burnetii* mediante PCR.

Discussione.

Gli aborti nelle aziende bovine e bufaline determinano gravi perdite economiche. In Italia meridionale l'incidenza degli aborti dovuti a malattie infettive è elevata e mancano tuttora dati organici che possano fornire una panoramica d'insieme sulle possibili cause di questo fenomeno (Capuano et al., 2004). In particolare, tra gli agenti eziologici responsabili di aborto, sono ancora scarsi i dati relativi a *C. burnetii*, anche se quelli disponibili indicano che nel Sud della nostra penisola la presenza di questo patogeno è piuttosto significativa. Infatti, uno studio condotto in allevamenti bovini e ovi-caprini della Puglia e della Basilicata ha evidenziato valori di incidenza di *C. burnetii* dell'11.6% e 21.5%, rispettivamente (Parisi et al., 2006), mentre, nella specie bufalina campana, sono stati riscontrati valori di prevalenza interaziendale variabili dal 17 al 23% (Galiero et al., 1996; Perugini et al., 2006). I dati riportati in questo studio confermano innanzitutto la presenza di *C. burnetii* sia negli allevamenti bovini che bufalini, e indicano che questo patogeno svolge un ruolo importante come agente abortigeno. In particolare, la specie bufalina sembra essere quella maggiormente interessata, e altri studi saranno pertanto necessari per chiarire l'e-

pidemiologia e la patogenesi della febbre Q nel bufalo, anche in considerazione del fatto che tale specie difficilmente viene parassitata da zecche e che gli episodi abortigeni si verificano principalmente in inverno.

In conclusione, sulla base dei dati riportati, appare fondamentale l'istituzione di specifici approfondimenti diagnostici e di opportuni piani di monitoraggio per l'attenta valutazione della prevalenza della patologia e del ruolo degli animali selvatici e dei vettori invertebrati nella diffusione di *C. burnetii*. Queste informazioni saranno utili per una corretta pianificazione delle attività di controllo e profilassi della febbre Q negli allevamenti campani.

BIBLIOGRAFIA

- E. ANGELAKIS, D. RAOULT (2010) - « Q Fever ». *Veterinary Microbiology*, 140: 297-309.
- M. BERRI, E. ROUSSET, C. HECHARD, J.L. CHAMPION, P. DUFOUR, P. RUSSO, A. RODOLAKIS (2005) - «Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd». *Veterinary Records* 156: 548-549.
- G. BORRIELLO, G. IOVANE, G. GALIERO (2010) - «La febbre Q negli animali domestici». *Large Animals Review* 16: 273-283.
- F. CAPUANO, A. PARISI, M. CAFIERO, L. PICARO AND D. FENIZIA (2004) - «*Coxiella burnetii*: what is the reality?». *Parassitologia* 46: 131-134.
- EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW). (2010) - «Scientific opinion on Q fever». *EFSA Journal* 8: 1595-1708.
- G. GALIERO, C.G. GOFFREDI, A. D'ORAZI (1996) - «Epidemiology of Q fever: seroprevalence in buffalo dairies of Salerno province». *Selezione Veterinaria*, 6: 407-412.
- J. KAZAR (1996) - «Q fever». In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Kazar, J., Toman, R. (Eds.), pp. 353-362, Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
- M. MAURIN, D. RAOULT (1999) - «Q fever». *Clinical Microbiology Reviews* 12: 518-553.
- A. PARISI, R. FRACCALVIERI, M. CAFIERO, A. MICCOLUPO, I. PADALINO, C. MONTAGNA, F. CAPUANO, R. SOTTILI (2006) - «Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR». *Veterinary Microbiology* 118: 101-106.
- A.G. PERUGINI, F. CAPUANO, A. ESPOSITO, C. MARIANELLI, A. MARTUCCIello, G. IOVANE, G. GALIERO (2009) - «Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: A preliminary report». *Research in Veterinary Science* 87: 189-191.

CELLULE SOMATICHE FUORI NORMA NEL LATTE DI MASSA: INDAGINE PRESSO AZIENDE PROBLEMA IN PROVINCIA DI RAGUSA

Cascone G. (*), Firrincieli V. (**), Spadola G. (***)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" (*)
Veterinario libero professionista provincia di Ragusa (**)
Agronomo libero professionista provincia di Ragusa (***)

Riassunto

È stata condotta una indagine su 104 aziende di bovine da latte della provincia di Ragusa con la conta delle cellule somatiche nel latte di massa al di sopra di 400.000 /ml, valore superiore al limite massimo imposto dal Reg. CE 853/2004. Il lavoro conferma che la cattiva gestione sanitaria della mandria, della mungitura e dell'impianto di mungitura sono alla base del problema. L'indagine ha messo in evidenza numerosi errori ed omissioni nelle procedure di gestione della mandria e della mungitura. Gli esami batteriologici effettuati su campioni di latte prelevato dai singoli quarti della mammella hanno evidenziato numerose specie batteriche causa di mastite.

Parole chiave: conta cellule somatiche, mastite, procedure errate

Summary

Somatic cells count out norm in the bulk tank milk : investigation in farms with problems in the province of Ragusa

An investigation has been conducted on 104 farms of the province of Ragusa with somatic cells count in bulk tank milk above 400.000 / ml, therefore superior to the ceiling imposed by the Reg. EC 853/2004. The job confirms that the sanitary mismanagement of the herd, of the milking and of the plant of milking are at the base of the problem. The investigation has put in evidence numerous errors and omissions in the procedures of management of the herd and the milking. The bacteriological examinations effected on milk's champions withdrawn by the single quarters of the udder have underlined numerous bacteria causes of mastitis.

Key words: somatic cells count, mastitis, wrong procedures.

Introduzione

Il lavoro è nato da una collaborazione tra la Provincia Regionale di Ragusa e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, è stato condotto su un gruppo di 104 aziende della provincia di Ragusa e svolto in otto mesi tra il 2009 e il 2010.



Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Bari



SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA
DI LABORATORIO VETERINARIA

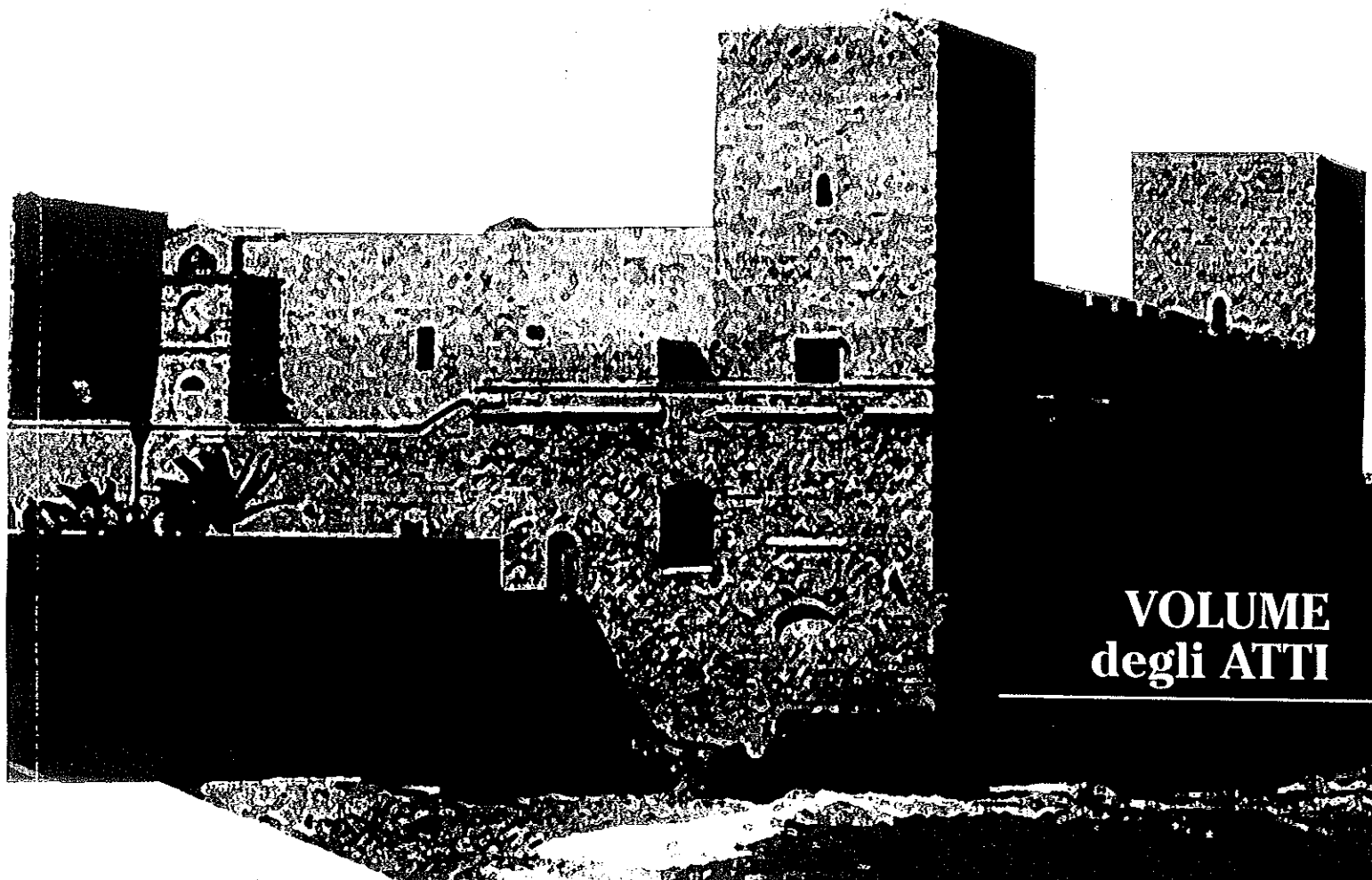
izs
Istituto zooprofilattico sperimentale
della Puglia e della Basilicata

XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Trani

Castello Svevo

12 - 14 Ottobre 2011



**VOLUME
degli ATTI**

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *COXIELLA BURNETII* IN FETI BOVINI E BUFALINI NELLA REGIONE CAMPANIA

Lucibelli M. G.¹, Auriemma C.¹, Borriello G.¹, Alfano F.¹, Gallo A.¹, De Carlo E.², Gallero G.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA);

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione Diagnostica di Salerno-Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline

Key words: *C. burnetii*, PCR

SUMMARY

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *C. burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoirs of infection and source of contamination for humans. The detection of *C. burnetii* in bovine and water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses collected from farms located in the Campania region showed a presence of 47% and 29%, respectively, in subjects negative to other aetiological agents. These results indicate that Q fever is a widespread disease, and proper monitoring plans would be necessary to set effective control and prophylaxis activities.

INTRODUZIONE

La febbre Q è una zoonosi causata da *Coxiella burnetii*, un batterio intracellulare diffuso in tutto il mondo e a lungo ignorata. *C. burnetii* può infettare una grande varietà di animali, tra cui ruminanti, cani, gatti, primati, roditori selvatici, rettili, anfibi, uccelli, pesci e zecche (1, 8). Tra i ruminanti domestici, bovini, ovini e caprini sono i principali reservoir di infezione e sono quindi tra le principali fonti di infezione per l'uomo. Le modalità di contagio da *C. burnetii* sono svariate, e quella principale per l'uomo è costituita dall'inalazione di particelle infette. La trasmissione del batterio attraverso aerosol contaminati può avvenire mediante contatto diretto con animali infetti, o, in modo particolare, con i prodotti del parto, quali liquido amniotico e placenta. L'estrema resistenza di questo patogeno agli agenti esterni lo rende persistente nell'ambiente (3). Le zecche non sono in grado di trasmettere l'infezione all'uomo, ma possono trasmetterla agli animali domestici, contribuendo così al mantenimento dell'agente infettivo nell'ambiente (7). Gli animali sono spesso cronicamente infetti, ma quasi sempre asintomatici. Durante la fase acuta *C. burnetii* può essere ritrovata nel sangue, nei polmoni, nella milza e nel fegato. Nelle femmine bovine *C. burnetii* si localizza nell'utero e nelle ghiandole mammarie e può essere eliminata attraverso il latte, le feci e le urine. L'eliminazione del microrganismo attraverso queste vie può persistere per parecchi mesi, anche per i soggetti che non hanno presentato problemi al momento del parto (2).

La febbre Q è endemica nei ruminanti domestici nella maggior parte, se non tutti, i paesi europei (5). Anche nell'uomo l'infezione è presente in tutti gli stati membri dell'UE e, in alcune circostanze epidemiologiche, gli effetti sulla salute pubblica possono essere significativi. Sebbene l'infezione sia comune, la malattia è rara ed, essendo spesso asintomatica, non viene sempre diagnosticata. Di conseguenza i dati disponibili spesso sottostimano le dimensioni del fenomeno.

Al fine di verificare la presenza di *C. burnetii* negli allevamenti bovini e bufalini della regione Campania sono state condotte specifiche indagini su feti abortiti che possono essere ritenuti un'ottima fonte di preziose informazioni epidemiologiche a tal riguardo.

MATERIALI E METODI

Estrazione del DNA

69 feti abortiti di cui 17 bovini e 52 bufalini sono stati prelevati da

39 allevamenti campani nel triennio 2009-2011 e testati per la ricerca di *C. burnetii* mediante una single-tube nested PCR (9). Di ciascun feto risultato negativo alla detection di *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *Leptospira* spp., Bubaline Herpesvirus 1, *Neospora caninum*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Toxoplasma* spp., sono stati prelevati differenti tessuti principalmente: polmone, fegato, abomaso e, quando disponibile, anche la placenta. Il DNA genomico totale è stato estratto dai tessuti congelati mediante l'utilizzo del QIAamp DNA mini kit (Qiagen) secondo le istruzioni riportate dal produttore. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante assorbimento di raggi UV. I DNA sono stati conservati a -20°C prima di essere utilizzati come template per la reazione di amplificazione.

Single tube nested-PCR

La reazione di amplificazione è stata condotta secondo il protocollo proposto da Parisi et al. (9) che utilizzava 0.5 mM di ogni primer interno (261F e 463R) e 0.005 mM di ogni primer esterno (Trans1 e Trans2). 5 ml di DNA è stato usato in un volume finale di 50 ml utilizzando HotStartTaq Master Mix e soluzione Q (Qiagen) alla concentrazione finale di 1X. Gli amplificati della lunghezza attesa (203bp) sono stati visualizzati mediante elettroforesi automatizzata utilizzando il Qiaxcel (Qiagen).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'indagine è stata condotta su un totale di 69 feti. Il DNA estratto da fegato, polmone, abomaso e dove è stato possibile placenta, è stato amplificato mediante una single-tube PCR nested per la detection di *C. burnetii*. I feti sono stati ritenuti positivi quando almeno uno degli organi campionati è risultato positivo. I risultati ottenuti hanno mostrato che il 47% (8/17) dei feti bovini e il 29% (15/52) dei feti bufalini testati hanno dato esito positivo alla ricerca di *C. burnetii* (Tab. 1).

Tab.1 – Ricerca di *C. burnetii* in feti bovini e bufalini

Specie	Feti esaminati	PCR + (%)
Bovini	17	8 (47)
Bufalini	52	15 (29)
Totale	69	23 (33)

Degli 8 feti bovini positivi, il 50% (4/8) presentava *C. burnetii* nel polmone, il 12% (1/8) nel fegato e il 62% (5/8) nell'abomaso. In un solo feto il patogeno è stato rilevato sia nel polmone che nel fegato.

Specie	Feti PCR +	Polmone PCR + (%)	Fegato PCR + (%)	Abomaso PCR + (%)	Placenta PCR + (%)
Bovini	8	4 (50)	1 (12)	5 (62)	0
Bufalini	15	7 (47)	8 (53)	3 (20)	4 (27)
Totale	23	11 (48)	9 (39)	8 (35)	4 (17)

Dei 15 feti bufalini positivi, *C. burnetii* è stata rilevata nel fegato di 8 feti (53%), nel polmone di 7 feti (47%), nell'abomaso di 3 feti (20%) e nella placenta di 4 feti (27%). 4 feti avevano sia fegato che polmone *Coxiella*-positivi, uno solo presentava contemporaneamente positività in fegato, polmone e placenta, e un unico feto presentava fegato, polmone e abomaso positivi (Tab.2).

Gli aborti nelle aziende bovine e bufaline determinano gravi perdite economiche. In Italia meridionale l'incidenza degli aborti dovuti a malattie infettive è elevata e mancano tuttora dati organici che possano fornire una panoramica d'insieme sulle possibili cause di questo fenomeno (4). In particolare, tra gli agenti eziologici responsabili di aborto, sono ancora scarsi i dati relativi a *C. burnetii*, anche se quelli disponibili indicano che nel Sud della nostra penisola la presenza di questo patogeno è piuttosto significativa. Infatti, uno studio condotto in allevamenti bovini e ovi-caprini della Puglia e della Basilicata ha evidenziato valori di incidenza di *C. burnetii* dell'11.6% e 21.5%, rispettivamente (9), mentre, nella specie bufalina campana, sono stati riscontrati valori di prevalenza interaziendale variabili dal 17 al 23% (6, 10).

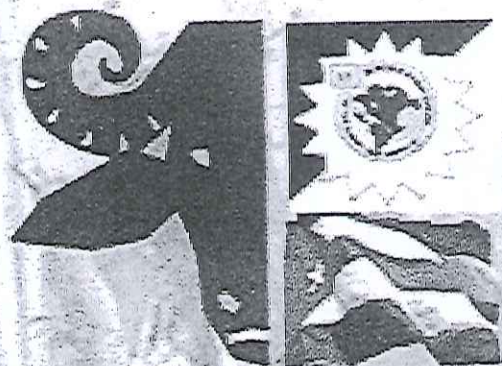
I dati riportati in questo studio confermano innanzitutto la presenza di *C. burnetii* sia negli allevamenti bovini che bufalini, e indicano che questo patogeno svolge un ruolo importante come agente abortigeno. In particolare, la specie bufalina sembra essere quella maggiormente interessata, e altri studi saranno pertanto necessari per chiarire l'epidemiologia e la patogenesi della febbre Q nel bufalo, anche in considerazione del fatto che tale specie difficilmente viene parassitata da zecche.

La single-tube nested PCR utilizzata per determinare la presenza di *C. burnetii* negli allevamenti bufalini e bovini sembra essere inoltre un metodo diagnostico particolarmente efficace. Questa tecnica, oltre alla sua elevata sensibilità, presenta il vantaggio di amplificare una regione più piccola dell'elemento d'inserzione IS111 grazie all'utilizzo di primers interni. In questo modo viene incrementata la possibilità di rilevare il DNA di *C. burnetii* in tessuti animali dove si assiste facilmente ad una degradazione del DNA per fenomeni di autolisi, come spesso accade nei feti animali.

In conclusione, sulla base dei dati riportati, appare fondamentale l'istituzione di specifici approfondimenti diagnostici e di opportuni piani di monitoraggio per l'attenta valutazione della prevalenza della patologia e delle vie di trasmissione di *C. burnetii*. Queste informazioni saranno utili per una corretta pianificazione delle attività di controllo e profilassi della febbre Q negli allevamenti campani.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Angelakis E, Raoult D (2010) - "Q Fever". *Veterinary Microbiology*, 140: 297-309.
- 2) Berri M, Rousset E, Hechard C, Champion JI, Dufour P, Russo P, Rodolakis A (2005) - "Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd". *Veterinary Records* 156: 548-549.
- 3) Borriello G, Iovane G, Galiero G (2010) - "La febbre Q negli animali domestici". *Large Animals Review* 16: 273-283.
- 4) Capuano F, Parisi A, Cafiero M, Picaro L, Fenizia D (2004) - "*Coxiella burnetii*: what is the reality?". *Parassitologia* 46: 131-134.
- 5) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2010) - "Scientific opinion on Q fever". *EFSA Journal* 8: 1595-1708.
- 6) Galiero G, Goffredi Cg, D'orazi A (1996) - "Epidemiology of Q fever: seroprevalence in buffalo dairies of Salerno province". *Selezione Veterinaria*, 6: 407-412.
- 7) Kazar J (1996) - "Q fever". In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Kazar, J., Toman, R. (Eds.), pp. 353-362, Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
- 8) Maurin M, Raoult D (1999) - "Q fever". *Clinical Microbiology Reviews* 12: 518-553.
- 9) Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, Capuano F, Sottili R (2006) - "Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR". *Veterinary Microbiology* 118: 101-106.
- 10) Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G (2009) - "Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: A preliminary report". *Research in Veterinary Science* 87: 189-191.



VI SIMPOSIO DE BÚFALOS DE LAS AMÉRICAS Y EUROPA

La Habana, Cuba. Noviembre 21-26, 2011

MEMORIAS

Trabajos, resúmenes y conferencias

MULTIMEDIA

**El Buffalypso, recurso zoogenético del
continente americano**

Poster

BACTERIOLOGICAL SURVEY FROM ABORTED FETUSES OF MEDITERRANEAN WATER BUFFALO (*BUBALUS BUBALIS*) IN SOUTHERN ITALY

¹E. De Carlo, ¹A. Martucciello, ¹D. Alfano, ²M.G. Lucibelli, ²F. Alfano, ²A. Gallo,
³A. Guarino, ²G. Galiero

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Sezione Diagnostica di Salerno, Centro di
Referenza Nazionale per l'Igiene e le Tecnologie dell'Allevamento e delle Produzioni Bufaline. Via
delle Calabrie n.27, 84132- Fuorni, Salerno, Italy. Tel./ fax: 0039-089301833/ 0039-089302699
e-mail: esterina.decarlo@cert.izsmpportici.it

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Dipartimento di Sanità Animale, Portici
(Napoli), Via Salute n.2, Portici (NA)

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Direzione, Portici, (Napoli), Via Salute
n.2, Portici (NA)

Abstract

A bacteriological survey carried out during the last ten years on 418 aborted fetuses randomly collected from 149 water buffalo herds in Southern Italy showed that *Chlamydophila* spp and *Brucella* spp. are the main abortive agents in this animal species. *Coxiella burnetii*, *Bacillus licheniformis* and *Arcanobacterium pyogenes* were also isolated as causative agents of a number of abortions. Although the eradication of these diseases may be of difficult accomplishment, good management, hygiene and sanitary practices are essential to control the diseases in the herd.

Keywords: water buffalo, abortion, bacteriological tests, PCR

1. Introduction

There are many factors causing abortion in domestic ruminants, such as the shifts of seasons and geographic locations (Kirkebride, 1995), malnutrition, mechanical injuries, genetic and allergic factors, infectious diseases, parasites, toxins, hormonal imbalance (Quinn et al., 2002). Although some of these factors have been widely discussed and well documented in Mediterranean water buffalo (Galiero and De Carlo, 1998; Campanile et al., 2004; Neglia et al., 2004), we found there still was the need of further studies on the role of bacteria in water buffalo abortion.

This study illustrates the main aetiological agents of abortion detected by serological and molecular analyses during the past ten years at the National Reference Center for Hygiene, Livestock, Farming Technologies and Buffalo Products

2. Materials and methods

We analyzed 418 fetuses received between 2000 and 2010 collected from 149 buffalo farms situated in Southern Italy. Abomasal contents and tissue samples from lungs, liver and brain were cultured on 5 % sheep blood agar (bioMerieux), MacConkey agar (Oxoid) and XLD agar (Oxoid). Samples were examined daily for 72 hours. Furthermore, specific enrichment and selective media and appropriate incubation conditions were used for the culture of *Brucella spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, and *Mycoplasma spp.* (Quinn et al., 1994).

The isolation was considered significant when the microorganism was isolated in large number and pure by at least one fetal organ.

The PCR was used to detect *Chlamydia spp.*, *Coxiella burnetii* and *Leptospira spp.*

3. Results

170 water buffalo fetuses (40.66 %) turned out to be positive to at least one of the pathogens investigated. Results and detection percentages of each microorganism are reported in table 1.

Table 1: Results of bacteriological and molecular survey carried out on 418 water buffalo fetuses

	n.	%
<i>Chlamydophila</i> spp.	32	7.65
<i>Brucella</i> spp.	28	6.69
<i>Bacillus licheniformis</i>	27	6.45
<i>Streptococcus</i> spp.	23	5.50
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	17	4.06
<i>Coxiella burnetii</i>	9	2.15
<i>Escherichia coli</i>	6	0.34
<i>Pasteurella multocida</i>	4	0.68
<i>Mannhemia haemolytica</i>	4	0.68
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	0.71
<i>Campylobacter</i> spp.	3	0.71
<i>Salmonella</i> spp.	2	0.47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0.47
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	0.47
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0.23
<i>Bacillus cereus</i>	1	0.23
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.23
<i>Leptospira</i> spp.	1	0.23
<i>Vibrio genitalis</i>	1	0.23
<i>Haemophilus</i> spp.	1	0.23
Unidentifiable bacteria	2	0.47

n.= N° diagnosed cases

%= diagnosed cases / total examined

4. Discussion and conclusion

The results of this survey show that *Chlamydophila abortus*, *C. pecorum* and *Brucella* spp. are the main bacterial pathogens causing abortion in Mediterranean water buffalo. The detected biovars of *Brucella* spp. were *B. abortus* biovars 1, 3, 6 and *B. melitensis* biovar 3. Besides *Brucella* spp. and *Chlamydophila* spp., *Coxiella burnetii* and *Bacillus licheniformis* were also found as additional causes of abortion. *Bacillus licheniformis*, after the initial isolation, turned out to be one of the pathogens most frequently responsible of infectious abortion in water buffalo and its presence is probably connected to the use of bedding or contaminated food (Galiero and De Carlo, 1998). *Arcanobacterium pyogenes* is an emerging pathogen, as it has been frequently isolated over the last two years. This bacterium is also responsible for mastitis, omphalitis, pneumonia and septicemia in water buffalo (Galiero, unpublished data). *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*, such as the other bacteria reported in table 1, are considered sporadic abortive pathogens.

Noticeably, *Listeria* spp., which is an important abortive pathogen in cattle and sheep, seemed not to be responsible of water buffalo abortion.

This survey, based on the results of bacteriological and molecular tests carried out on water buffalo aborted fetuses in Southern Italy, is the widest and the most detailed study in the Campania region until now. The survey proved that bacterial pathogens play a key role in water buffalo abortion. In the farms where these pathogens are endemic, specific prophylaxis interventions and focused therapies are required in order to avoid infection and to keep down the economic loss due to water buffalo abortion.

Finally, the bacteria isolated from aborted water buffalo fetuses appear similar to those detected in cattle and small ruminants.

Reference

- G. Campanile, G. Neglia, B. Gasparrini, G. Galiero, A. Prandi, R. Di Palo, M. D'Occhio, L. Zicarelli, Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function *Theriogenology* **63**: (2004) pp.2334-2340.
- G.Galiero, E. De Carlo, Abortion in water buffalo (*Bubalus bubalis*) associated with *Bacillus licheniformis*, *Vet. Rec.* **143** (1998), pp. 640.
- Kirkebride C.A. Managing an outbreak of livestock abortion-2: diagnosis and control of bovine abortion, *Vet. Med.* **5** (1995), pp. 70-79
- G.Neglia, C. Grassi, A. Prandi, G. Galiero, E. De Carlo, L. Zicarelli, G. Campanile, 138 early embryo mortality in buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spring period. *Reprod., Fertil. and Dev.* **16** (2): 191 (2004)
- P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter, Clinical Veterinary Microbiology, *Mosby-Year Book Europe Limited*, London (1994), pp. 144-272.

S3. Estudio bacteriológico realizado en fetos abortados de búfalos Mediterráneos (*Bubalus bubalis*) en el sur de Italia

¹E. De Carlo, ¹A. Martucciello, ¹D. Alfano, ²M.G. Lucibelli, ²F. Alfano, ²A. Gallo, ³A. Guarino, ²G. Galiero

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione Diagnostica di Salerno-Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline

Via delle Calabrie 27 - 84132 Fuorni-Salerno tel. 0039 089301833 fax 0039 089302699

e-mail: esterina.decarlo@cert.izsmportici.it

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (Napoli), Via Salute n.2, Portici (NA)

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Direzione, Portici, (Napoli), Via Salute n.2, Portici (NA)

Resumen:

Los autores analizaron los resultados de pruebas bacteriológicas realizadas durante los últimos 10 años, en 418 fetos abortados, que han sido recolectados al azar, provenientes de 149 rebaños de búfalos situados en el sur de Italia. Los resultados de esta investigación muestran que *Chlamydomphila* spp y *Brucella* spp son los principales patógenos abortivo entre los búfalos mediterráneos de la región. *Coxiella burnetii*, *Bacillus lincheniformis*, *Arcanobacterium pyogenes*, también son aislados como responsables de la otra parte en los casos de abortos. Sin embargo la erradicación de estas enfermedades puede presentar un gran número de obstáculos, el buen manejo y prácticas higiénicas y sanitarias han probado ser esenciales para controlar estas enfermedades.

Palabras Claves: Búfalo de Agua, aborto, Prueba bacteriológicas, PCR

Introducción

Hay muchos factores causantes de abortos en rumiantes domésticos, como lo son los cambios de estación y áreas geográficas (Kirkebride, 1995), desnutrición, lesiones mecánicas, factores genéticos y alérgicos, enfermedades infecciosas, parásitos, toxinas, desbalances hormonales (Quinn et al., 1994). Aunque algunos de éstos factores han sido discutidos y muy bien documentados en la producción del búfalo del mediterráneo (Galiero y De Carlo, 1998; Campanile et al., 2004; Neglia et al., 2004), nos pareció que existía la necesidad de realizar estudios más profundos, en donde se analizara el papel de las bacterias en los casos de abortos presentados por búfalos. En la investigación se recopilaron los resultados de pruebas bacteriológicas y de PCR, que han sido realizadas durante los últimos diez años en el Centro Nacional de Referencia para la Higiene, Ganadería, Tecnologías Agrícolas y Productos de Búfalo.

Materiales y Método

Fueron analizados 418 fetos recibidos entre el 2000 y el 2010, colectados de 149 granjas de búfalos situadas en el sur de Italia. Contenido abomasal y muestras de tejido de pulmón, hígado y cerebro fueron cultivados en agar con 5% de sangre ovina (BioMerieux), agar McConkey (oxoid), y agar XLD. Los cultivos fueron examinados diariamente por 72 horas. Además medios selectivos y de enriquecimiento como condiciones apropiadas de incubación, fueron usadas para el cultivo de *Brucella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. y *Mycoplasma* spp. (Quinn et al., 1949).

El aislamiento se consideró significativo cuando el microorganismo fuera aislado en un gran número de colonias y puro, en por lo menos una muestra fetal.

La técnica de PCR, fue usada para la detección de *Chlamydomphila* spp., *Coxiella burnetii* y *Leptospira* spp.

Resultados

170 fetos (40.66 %) fueron encontrados positivos. Los resultados y los porcentajes de cada detección, derivada de los aislamientos de dichas muestras, están presentados en la tabla 1

Tabla 1: Resultado del estudio bacteriológico y molecular llevado a cabo en 418 fetos muestreados

	n	%
<i>Chlamydophila</i> spp.	32	7.65
<i>Brucella</i> spp.	28	6.69
<i>Bacillus licheniformis</i>	27	6.45
<i>Streptococcus</i> spp.	23	5.50
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	17	4.06
<i>Coxiella burnetii</i>	9	2.15
<i>Escherichia coli</i>	6	0.34
<i>Pasteurella multocida</i>	4	0.68
<i>Mannheimia haemolytica</i>	4	0.68
<i>Campylobacter</i> spp.	3	0.71
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	0.71
<i>Salmonella</i> spp.	2	0.47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0.47
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	0.47
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0.23
<i>Bacillus cereus</i>	1	0.23
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.23
<i>Leptospira</i> spp.	1	0.23
<i>Vibrio genitalis</i>	1	0.23
<i>Haemophilus</i> spp.	1	0.23
Unidentifiable bacteria	2	0.47

n.=N de casos diagnosticados positivos

%= casos diagnosticados / total de muestras examinadas

Discusión y Conclusiones

Los resultados de éste estudio muestran que *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* y *Brucella* spp. son los principales bacterios patógenos causantes de abortos en el búfalo del mediterráneo. Los biovars de *Brucella* más comunes detectados fueron: *Brucella abortus* biovariedades 1, 3, 6 y *Brucella melitensis* biovariedad 3. Además de *Brucella* spp. y *Chlamydophila* spp., *Coxiella burnetii* y *Bacillus licheniformis*, son las otras principales causas de abortos. *Bacillus licheniformis*, después de los primeros aislamientos, resultó ser uno de los principales agentes etiológicos en la infección del aborto en búfalos y esto está probablemente relacionado con el uso de camas o alimentos contaminados con dicho patógeno (Galiero and De Carlo, 1998). *Arcanobacterium pyogenes* constituye una bacteria emergente dentro del grupo de patógenos causantes de abortos, ya que ha sido frecuentemente aislado en los últimos dos años. Esta bacteria es también responsable de casos de mastitis, onfalitis, neumonías y septicemias en búfalos (Galiero, datos no publicados). *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, del mismo modo que las otras bacterias reportadas en la tabla 1, son consideradas patógenos abortivos esporádicos.

Notablemente, *Listeria* spp., que es un patógeno abortivo común en bovinos y ovinos, mostró no ser responsable de abortos en los búfalos considerados en este trabajo.

Este estudio, basado en los resultados de pruebas bacteriológicas y moleculares realizadas a fetos abortados de búfalo en el sur de Italia, es el más amplio y detallado en la región hasta ahora. El estudio demostró que las bacterias son patógenos importantes en el aborto del búfalo. En las granjas donde éstos patógenos son endémicos, intervenciones profilácticas específicas y terapias puntuales, son necesarias con el fin de evitar las infecciones bactericas y reducir las pérdidas económicas debidas a los abortos en búfalos.

Finalmente, las bacterias aisladas de entre los abortos de búfalos son similares a aquellos detectados en vacas y pequeños rumiantes.

Bibliografías

G. Campanile, G. Neglia, B. Gasparrini, G. Galiero, A. Prandi, R. Di Palo, M. D'Occhio, L. Zicarelli, Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function *Theriogenology* **63**: (2004) pp.2334-2340.

G.Galiero, E. De Carlo, Abortion in water buffalo (*Bubalus bubalis*) associated with *Bacillus licheniformis*, *Vet. Rec.* **143** (1998), pp. 640.

Kirkebride C.A. Managing an outbreak of livestock abortion-2: diagnosis and control of bovine abortion, *Vet. Med.* **5** (1995), pp. 70-79

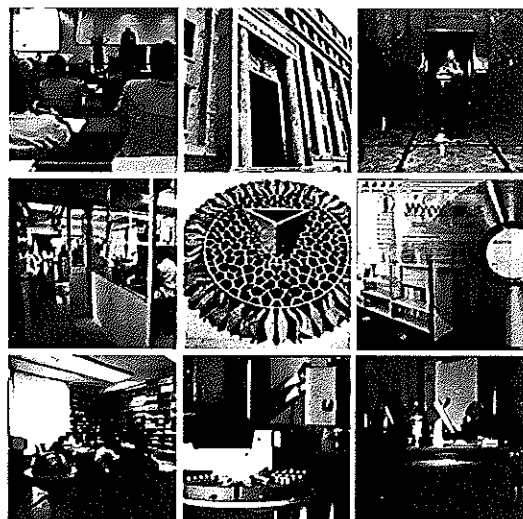
G.Neglia, C. Grassi, A. Prandi, G. Galiero, E. De Carlo, L. Zicarelli, G. Campanile, 138 early embryo mortality in buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spring period. *Reprod., Fertil. and Dev.* **16** (2): 191 (2004)

P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter, Clinical Veterinary Microbiology, *Mosby-Year Book Europe Limited*, London (1994), pp. 144-272.



ISTISAN Congressi

12/C2



ISSN 0393-5620

VIII Workshop Nazionale Enter-net Italia
Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche

Infezioni trasmesse da alimenti e acqua:
diagnostica ed epidemiologia

Vietri sul Mare, Salerno
31 maggio-1 giugno 2012



RIASSUNTI

A cura di C. Graziani,
F. Mancini e I. Luzzi



www.iss.it

P5 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FENOTIPICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* (ETEC, STEC E NTEC) ISOLATI DA VITELLI BUFALINI AFFETTI DA GASTROENTERITE

Giorgia Borriello, M. Gabriella Lucibelli, Clementina Auriemma, Flora Alfano, Luigi Luongo, Nunzia Riccone, Rita Nappi, Giorgio Galiero, Achille Guarino
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

Introduzione. Le infezioni da *Escherichia coli* possono essere provocate sia nell'uomo che negli animali da diversi patotipi, principalmente ETEC, EHEC inclusi STEC, ed EPEC. Questi patotipi possono indurre una varietà di sintomi diversi, come diarrea, colite emorragica, infezioni extra-intestinali. I meccanismi patogenetici coinvolti nella malattia possono essere attribuiti a fattori di virulenza diversi, tra cui enterotossine, fattori di colonizzazione quali flagelli, fimbrie, capsule, lipopolisaccaride, emolisine e adesine. A questi si possono aggiungere ulteriori fattori quali il fattore citotossico necrotizzante (CNF), la tossina citotale (CDT) e l'intimina. *E. coli* è tra i principali agenti patogeni dei vitelli bufalini entro il primo mese di vita, nei quali è responsabile di gastroenterite. Gli scopi di questo studio sono stati di valutare la presenza di ETEC, STEC e NTEC in vitelli bufalini affetti da gastroenterite e di caratterizzare i ceppi isolati per la presenza di fattori di virulenza e la resistenza antibiotica.

Metodi. Lo studio è stato condotto nella Regione Campania su 248 vitelli bufalini entro il primo mese di vita, affetti da gastroenterite. I ceppi di *E. coli* sono stati isolati/identificati dalle feci mediante metodo microbiologico/biochimico. Gli isolati sono stati poi caratterizzati per specifici fattori di virulenza mediante PCR. L'attività emolitica è stata valutata in seguito a crescita su agar sangue di montone. Tutti i ceppi sono stati caratterizzati per la suscettibilità a 11 antibiotici mediante la tecnica di Kirby-Bauer (CLSI).

Risultati. Dall'analisi dei campioni di feci sono stati isolati 188 ceppi di *E. coli* tra cui 4 (2%) ETEC, 13 (6%) STEC e 40 (21%) NTEC. Tre ceppi ETEC sono risultati LT-positivi, mentre uno stipite è risultato ST-positivo. Gli STEC sono risultati tutti STX e intimina-positivi, e sono stati classificati come AECC. Tra questi, 5 hanno mostrato anche attività emolitica e sono stati classificati come EHEC. Tutti i NTEC sono risultati CNF-positivi e hanno esibito anche attività emolitica. I ceppi di *E. coli* sono stati infine caratterizzati per la resistenza a 11 antibiotici, e hanno mostrato resistenze elevate, particolarmente per AMC (90,7%), OT (84,1%) e AMP (82,2%).

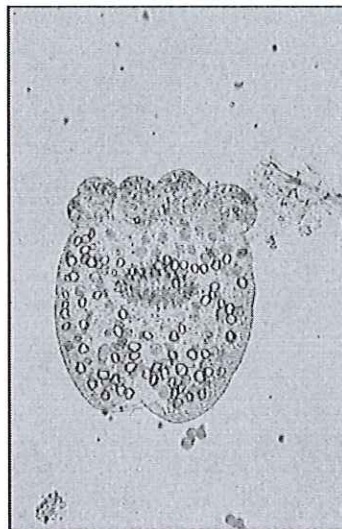
Conclusioni. I risultati di questo studio hanno mostrato che *E. coli* è un patogeno importante del vitello bufalino, e forniscono un quadro chiaro della distribuzione dei diversi patotipi in questa specie animale. In particolare, i ceppi NTEC sono risultati quelli più diffusi nei vitelli bufalini affetti da gastroenterite, e l'ampio numero dei fattori di virulenza espressi evidenzia il loro elevato potere patogeno.



SOIPA
Società Italiana di Parassitologia

SOCIETÀ ITALIANA DI PARASSITOLOGIA

XXVII Congresso Nazionale



Alghero 26-29 giugno 2012



Dipartimento di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Sassari



Molecular detection of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous buffalo abortions

Auriemma C.¹, Lucibelli M.G.¹, Alfano F.¹, Borriello G.¹, Del Piano F.¹, Ragosta C.¹, Francese A.¹, D'Amore M.¹, Guarino A.¹, Galiero G.¹

¹Department of Animal Health, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute 2, 80055, Portici, Naples, Italy

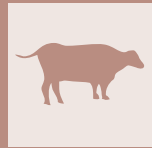
AIM: *Neospora caninum* is a recognized genus of pathogenic coccidian, closely related to *Toxoplasma gondii*, that can cause abortion or congenital disease in a variety of domestic animal hosts. The aim of this study was to describe the presence of *N. caninum* infection in fetuses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the Campania region (Southern Italy) by PCR assay. The DNA of *N. caninum* was detected and identified in the heart of three buffalo fetuses. The amplified products were instead purified and sequenced, confirming the presence of *N. caninum* in the samples. The present study is the first to report evidence of *N. caninum* in aborted water buffalo fetuses in Southern Italy.

MATERIALS AND METHODS: Three aborted buffalo fetuses between the fourth and sixth months of gestation were sent to the IZSM in 2011 for general aetiological diagnosis. Different tissues were tested for each fetus, mainly brain and heart, target tissues for the diagnosis of *N. caninum*-related abortion. Fetal tissues were obtained and fixed in 10% buffered formalin embedded in paraffin, cut at 4 µm and stained (H/E) for histopathological analysis. Samples of brain and heart were subjected to PCR for the detection of *N. caninum*. After DNA extraction with a commercial kit (QIAamp DNA mini kit, Qiagen), the amplification was carried out employing primers targeting a region of the small subunit (ssu)-rRNA gene (18S) as described by Magnino et al. (Magnino S et al, 2000, *Sel Vet* S15-S23). A restriction analysis was then performed on the amplified products by digestion with the BseDI enzyme (MBI Fermentas) for a simultaneous differentiation among *N. caninum* and *T. gondii*. To confirm the presence of *N. caninum*, the DNA isolated from fetal tissues was also tested by hemi-nested PCR of the Nc5 gene (Baszler TV et al, 1999, *J Clin Microbiol* 37: 4059-4064; Yamage M et al, 1996, *J Parasitol*, 82: 272-9). Amplification products were analysed by automated electrophoresis (QIAxcel, QIAgen). The Nc5 amplicons were instead purified (Qiaquick purification kit, Qiagen) and bi-directionally sequenced using Big Dye Terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems). Sequences were analysed by multiple alignment using BioEdit software and the CLUSTAL W alignment method.

RESULTS: No macroscopic lesions were observed in aborted fetuses analysed. Histological lesions of tissue samples were observed in the three infected fetuses and were defined as "characteristic" of *Neospora* infection in according to previous descriptions (González L et al, 1999, *Vet Rec* 144: 145-150). In all analysed fetuses, samples of heart were positive for the small-subunit rRNA gene (18S). DNA amplification yielded a fragment of 294 bp, expected product length for *N. caninum* and *T. gondii*. (Fig.1). BseDI restriction patterns yielded three bands (size: 85, 92, 105 bp) that were very close and appeared as thick band in the gel, as expected for *N. caninum*. (Fig.2). Samples of heart were also positive to Nc5 gene, a band of 227 bp length were found in these samples. (Fig.3). Sequencing of *N. caninum* PCR product amplified, confirmed homology with the published Nc5 sequence deposited in GenBank by Chrysafidis et al. (DQ059068) (Chrysafidis AL et al, 2011, *Parasitol Res* 108: 741-743). (Fig.4).

CONCLUSIONS: The causes of reproductive failure in buffaloes due to *Neospora caninum* in Italy have not been characterized; nevertheless, a high proportion (34.6%) of *Neospora*-seropositive water buffalo have reported in Campania region (Guarino A et al, 2000, *Vet Parasitol* 91: 15-21). Although evidence of natural *Neospora* infections have been described (Rodrigues AAR et al, 2004, *Vet Parasitol*, 124: 139-150) but spontaneous abortion caused by *N. caninum* has not yet reported in water buffaloes. In this study we have reported the first molecular detection and identification of *N. caninum* in fetal tissues from spontaneous buffalo abortion in the absence of another pathogens associated with abortion and reproductive disorders in these species. We have demonstrated that *N. caninum* plays a significant role in abortion of water buffalo and the PCR technique represents an excellent and practical assay to neosporosis diagnosis in fetal tissues. It is likely that *N. caninum* infections are responsible for sporadic abortions in Southern Italy, rather than multiple cases, but more investigation is required for this assumption to be shown to be valid.

Le gastroenteriti infettive del vitello bufalino: identificazione e caratterizzazione dei principali agenti eziologici in allevamenti campani



G. BORRIELLO¹, M.G. LUCIBELLI¹, C. AURIEMMA¹, F. ALFANO¹, A. GALLO¹, F. BOVE¹, M.L. BUONANNO², A. CERRONE¹, N. RICCONI¹, A. GUARINO¹, G. GALIERO¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici

² Medico veterinario libero professionista

RIASSUNTO

Nel presente studio sono stati ricercati gli agenti eziologici infettivi responsabili di gastroenterite in vitelli bufalini entro il primo mese di vita. Le feci di 248 vitelli affetti da gastroenterite sono state analizzate per la ricerca di *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. ed *Eimeria* spp. *C. perfringens* è risultato il patogeno più frequente (28%). *E. coli* patogeni, *Salmonella* spp. e *Cryptosporidium* spp. sono stati isolati nel 23%, 20% e 17% dei casi, rispettivamente. Rotavirus, Coronavirus, *Eimeria* spp. e *Giardia* spp. sono stati individuati nel 7%, 4%, 4% e 3% dei casi, rispettivamente. Gli isolati di *E. coli* sono stati caratterizzati per la presenza dei principali fattori di virulenza (*lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *eae*, *cdt*, *cnf*, *F17*) e per la capacità emolitica. Sono stati così individuati ceppi ETEC (2%), STEC (7%) e NTEC (21%). La sierotipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. ha identificato un elevato numero di sottospecie di *S. enterica*, tra cui Typhimurium (26%), Muenster (10%) e Give (10%). La fagotipizzazione dei 13 isolati di *S. Typhimurium* ha mostrato 9 diversi profili. Gli isolati di *C. perfringens* sono stati caratterizzati per la produzione delle tossine alfa, beta, beta2, iota, epsilon ed enterotossina E. L'81% dei ceppi è risultato positivo alla tossina α , il 12% alle tossine α e β 2, il 3% alle tossine α , β 2 ed enterotossina. I ceppi di *E. coli* e *Salmonella* sono stati valutati per la suscettibilità a 16 antibiotici, mostrando elevati livelli di multi-resistenza. I risultati riportati in questo studio confermano l'ampia e variegata presenza di agenti eziologici in vitelli bufalini affetti da gastroenterite e sottolineano la presenza diffusa di fenomeni di antibiotico-resistenza.

PAROLE CHIAVE

Gastroenteriti infettive, vitello bufalino, epidemiologia.

INTRODUZIONE

Le gastroenteriti del vitello bufalino rappresentano una delle problematiche sanitarie più comuni e diffuse nell'ambito delle patologie di questa specie animale e ancora oggi incidono grandemente sull'economia aziendale¹.

I microrganismi sinora messi in evidenza quali responsabili di patologie enteriche del vitello bufalino entro le prime quattro settimane di vita, sono rappresentati principalmente da *E. coli*, *Salmonella* spp., Rotavirus e *Cryptosporidium* spp.^{1,2,3}. La sintomatologia è caratterizzata da diarrea e conseguente disidratazione, che può presentarsi in forme più o meno gravi. Talvolta, al coinvolgimento del tratto gastroenterico si accompagna anche quello di altri distretti, e questo accade quando ad essere coinvolti sono batteri in grado di dare setticemia o di produrre tossine che, attraverso il circolo sanguigno, raggiungono diversi organi bersaglio, quali apparato respiratorio, articolazioni e sistema nervoso centrale. Inoltre, i microrganismi patogeni possono agire in associazione nello stesso animale, contribuendo a rendere più complesso il quadro delle misure terapeutiche e profilattiche da intraprendere nelle aziende interessate¹.

Molti dei microrganismi patogeni responsabili di gastroenterite nel vitello bufalino sono caratterizzati dalla presenza di

fattori di virulenza, implicati nella patogenesi e nella evoluzione della sindrome gastro-enterica. In particolare, le infezioni da *E. coli* possono essere causate da diversi patotipi, principalmente *E. coli* enterotossici (ETEC), *E. coli* enteropatogeni (EPEC), ed *E. coli* produttori di tossine Shiga (STEC)^{4,5}. Questi patotipi possono indurre una varietà di sintomi, tra cui diarrea, colite emorragica e infezioni extra-intestinali⁵. I loro meccanismi patogeni possono essere attribuiti a diversi fattori di virulenza quali enterotossine (tossina termolabile - LT, e tossina termostabile - ST, simili alle tossine coleriche e in grado di fungere da fattori di adesione), tossine Shiga (Stx1 e Stx2, che inducono la morte cellulare inibendo la sintesi proteica) e fattori di colonizzazione (flagelli, capsule, lipopolisaccaride, adesine e fimbrie - tra cui le fimbrie della famiglia F17)⁵. Inoltre, spesso in associazione a casi di infezioni extra-intestinali, possono essere isolati *E. coli* necrotossici (NTEC), caratterizzati dalla presenza di fattori citotossici necrotizzanti (CNF1 e CNF2) e/o di una tossina citotale (CDT), tutti fattori in grado di indurre morte cellulare. Alcuni o tutti questi patotipi possono esprimere ulteriori fattori di virulenza quali l'intimina, codificata dal gene *eae*, e le emolisine, ad azione citotossica. Gli isolati della specie *C. perfringens*, invece, possono essere classificati in cinque diversi tossino-tipi (A, B, C, D, E) in funzione della produzione delle quattro principali tossine ad azione citotale: alfa, beta, epsilon e iota. Tra queste, il ruolo principale nell'induzione della gastroenterite è svolto dalla tossina α , capace di causare lisi cellulare mediante idrolisi della membrana fosfolipidica. Insieme a queste tossine, anche la enterotossina

Autore per la corrispondenza:

Giorgia Borriello (giorgia.borriello@izsmportici.it).

E e la tossina beta-2 possono svolgere un ruolo nell'induzione di sindromi gastroenteriche^{5,6}.

La diffusione di questi patogeni, particolarmente *E. coli* e *Salmonella* spp., negli allevamenti di ruminanti domestici rappresenta oggi un ulteriore motivo di allarme a causa della presenza e diffusione di batteri antibiotico-resistenti in risposta all'ampio e indiscriminato uso di antibiotici per il trattamento di malattie infettive nei giovani animali⁴.

In letteratura sono piuttosto limitati gli studi sistematici volti a valutare le cause infettive di enterite del vitello bufalino e l'eventuale co-presenza nello stesso soggetto o nella stessa azienda di più microrganismi patogeni. Lo scopo del presente lavoro è stato di valutare, in aziende bufaline con elevati tassi di morbidità e mortalità dei vitelli entro il primo mese di vita, il tipo e la prevalenza degli agenti eziologici riscontrabili in corso di patologia enterica, e la frequenza con la quale tali microrganismi si isolano contestualmente.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed analisi

Questo studio è stato condotto nella regione Campania durante gli anni 2009-2010, su 248 vitelli bufalini allevati in 25 aziende diverse. Mediamente in ogni allevamento sono stati campionati 10 ± 3 soggetti. Gli animali avevano un'età compresa tra 1 giorno e 4 settimane e risultavano tutti affetti da sindrome gastroenterica. Feci fresche sono state raccolte direttamente dall'ampolla rettale, prima di qualunque trattamento antibiotico, e immediatamente refrigerate a 4°C. I campioni sono stati trasportati refrigerati e analizzati entro 24h dal ricevimento per la ricerca di *Salmonella* spp., *E. coli*, *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., Coronavirus, Rotavirus e *C. perfringens*.

Rotavirus e Coronavirus sono stati ricercati mediante RT-PCR classica utilizzando i primer e i protocolli riportati in letteratura^{7,8}. Per *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. è stato utilizzato un test immunocromatografico (OXOID, Ltd, Basingstoke, UK). La presenza di *Eimeria* spp. è stata esaminata mediante flottazione⁹. *E. coli* e *C. perfringens* sono stati isolati mediante metodo microbiologico⁵. Brevemente, campioni di feci (10 g) sono stati sospesi in PBS (10 ml) e diluiti serialmente per la semina su specifici terreni di coltura. *C. perfringens* è stato isolato in seguito a semina su agar sangue e incubazione a 37°C per 48h in condizioni di anaerobiosi; *E. coli* è stato isolato in seguito a semina su agar sangue e MacConkey agar e incubazione a 37°C per 24-48h in condizioni di aerobiosi. *E. coli* è stato considerato come plausibilmente correlato alla sindrome diarroica solo quando riscontrato in concentrazioni non inferiori a 10^8 UFC/g di contenuto intestinale⁴. L'isolamento di *Salmonella* spp. è stato effettuato secondo quanto indicato nella relativa norma ISO¹⁰. Tutti i ceppi microbici isolati sono stati confermati mediante tipizzazione biochimica (VITEK 2).

Caratterizzazione molecolare e fenotipica dei ceppi batterici isolati

I ceppi di *E. coli* sono stati caratterizzati per la presenza di specifici fattori di virulenza (*lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *eae*, *cnf*, *cdt*, *F17*) mediante i primer e i protocolli di PCR classica riportati in letteratura⁴. In particolare la caratterizzazione molecolare è stata eseguita su tre colonie distinte per ognuno dei campio-

ni positivi. L'attività emolitica (hly) per ciascun ceppo è stata definita valutando l'alone di emolisi in seguito a crescita su agar al 5% di sangue di montone.

Le salmonelle isolate sono state sierotipizzate secondo lo schema di Kaufmann-White¹¹. I ceppi isolati di *S. Typhimurium* sono stati fagotipizzati dal Centro di Riferenza Nazionale Italiano per le Salmonellosi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie).

I ceppi di *C. perfringens* (tre singole colonie per ogni campione positivo) sono stati caratterizzati per la produzione di tossine mediante i primer e i protocolli di PCR classica descritti in letteratura⁶.

Antibiogrammi

Tutti i ceppi di *E. coli* e di *Salmonella* spp. isolati sono stati caratterizzati per la suscettibilità/resistenza agli antibiotici mediante la tecnica di diffusione di Kirby-Bauer su Mueller-Hinton Agar (Oxoid), secondo quanto indicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute¹². I ceppi di *E. coli* sono stati saggiati per la sensibilità ai seguenti 16 antibiotici: acido nalidixico (ANA), amoxicillina (AMC), amoxicillina/acido clavulanico (AMCL), ampicillina (AMP), apramicina (APR), colistina solfato (CT), enrofloxacin (ENO), flumequina (FLUMEQ), gentamicina (GN), neomicina (N), ossitetraciclina (OT), sulfametoxazolo/trimetoprim (SXT), tetraciclina (TE), penicillina (PG), marbofloxacin (MAFL), lincomicina (MY). I ceppi di *Salmonella* spp. sono stati saggiati per la sensibilità ai seguenti 16 antimicrobici: acido nalidixico (ANA), ampicillina (AMP), cefotaxime (CEF), ciprofloxacina (CIP), cloramfenicolo (CLO), gentamicina (GN), kanamicina (KAN), streptomycin (STR), sulfonamidi (SUL), tetraciclina (TE), sulfametoxazolo/trimetoprim (SXT), colistina solfato (CT), amoxicillina/acido clavulanico (AMCL), enrofloxacin (ENO), cefalotina (CF), ceftazidime (CAZ).

RISULTATI

Frequenza di isolamento degli agenti eziologici responsabili di gastroenterite

I risultati dell'indagine diagnostica sugli agenti eziologici più frequentemente riscontrati nelle feci di vitelli bufalini affetti da gastroenterite sono riassunti in Tabella 1. *C. perfringens* è risultato il patogeno più frequentemente isolato (28% dei casi). *E. coli* è stato isolato nel 76% dei casi, e 57 isolati (23% del totale dei casi di gastroenterite) sono risultati positivi alla ricerca di fattori di virulenza e/o di emolisine, in accordo con quanto precedentemente riportato⁴. *Salmonella* spp. e *Cryptosporidium* spp. sono stati isolati nel 20% e 17% dei casi, rispettivamente. Rotavirus, Coronavirus, *Eimeria* spp. e *Giardia* spp. sono stati individuati nel 7%, 4%, 4% e 3% dei casi, rispettivamente.

In Tabella 1 sono riportati anche i valori di prevalenza interaziendale dei patogeni ricercati.

Le analisi diagnostiche effettuate hanno indicato in un certo numero di casi la presenza di più di un patogeno in uno stesso campione, con tipologie di isolamenti contestuali estremamente variegata. La Tabella 2 illustra pertanto il grado di associazione dei patogeni riscontrati nei diversi campioni. In particolare i dati ottenuti indicano che circa un terzo dei casi di gastroenterite risulta ad eziologia multipla, con un nu-

Tabella 1 - Valori di frequenza e di prevalenza interaziendale dei diversi agenti eziologici di gastroenterite nel vitello bufalino.

Patogeno	N. isolati	Frequenza (%)	N. aziende	Prevalenza interaziendale (%)
<i>C. perfringens</i>	69	28	9	36
<i>E. coli</i> ^a	57	23	8	32
<i>Salmonella</i> spp.	49	20	7	28
<i>Cryptosporidium</i> spp.	42	17	7	28
Rotavirus	17	7	4	16
Coronavirus	10	4	3	12
<i>Eimeria</i> spp.	10	4	2	8
<i>Giardia</i> spp.	7	3	1	4

^a In tabella sono riportati i valori relativi agli isolati di *E. coli* dotati di almeno uno dei fattori di virulenza ricercati (*E. coli* patogeni).

Tabella 2 - Grado di associazione degli agenti eziologici di gastroenterite nel vitello bufalino.

Patogeno	Numero casi di isolamento singolo o contestuale ad altri patogeni				TOT
	Senza altri patogeni	Con 1 diverso patogeno	Con 2 diversi patogeni	Con 3 diversi patogeni	
<i>C. perfringens</i>	41	19	7	2	69
<i>E. coli</i> patogeni	24	27	6	0	57
<i>Salmonella</i> spp.	24	21	2	2	49
<i>Cryptosporidium</i> spp.	20	17	5	0	42
Rotavirus	3	7	5	2	17
Coronavirus	6	3	0	1	10
<i>Eimeria</i> spp.	4	5	0	1	10
<i>Giardia</i> spp.	4	1	2	0	7

mero minimo di patogeni associati pari a 2, fino ad un massimo di 4 diversi microrganismi riscontrati contemporaneamente in uno stesso campione.

La Tabella 3 riporta invece nel dettaglio le frequenze con cui ogni singolo patogeno è risultato contemporaneamente presente nello stesso soggetto con ognuno degli altri diversi agenti eziologici oggetto di studio, e mostra che il patogeno più frequentemente isolato contestualmente ad altri patoge-

ni è Rotavirus, che è stato di fatto riscontrato da solo soltanto nel 18% dei casi (3/17), mentre è risultato spesso isolato contestualmente a *C. perfringens* (41%), *E. coli* patogeni (35%) e *Salmonella* spp. (24%).

Altri casi di isolamenti contestuali piuttosto frequenti (>20%) sono risultati quelli di *Giardia* spp. con *E. coli* patogeni e *C. perfringens* (43% e 29%, rispettivamente), ed *Eimeria* spp. con *E. coli* patogeni (30%). Non sono invece mai stati riscontrati contemporaneamente i patogeni *Giardia* spp. ed *Eimeria* spp., *Giardia* spp. e Coronavirus o Rotavirus, *Eimeria* spp. e Coronavirus. Più in generale, gli agenti virali (Rotavirus e Coronavirus) e quelli protozoari, quali *Giardia* spp. ed *Eimeria* spp., sono risultati essere quelli isolati meno frequentemente, sia da soli, che contestualmente ad altri patogeni.

Caratterizzazione degli isolati di *E. coli*

Le analisi eseguite sulle feci provenienti da 248 vitelli bufalini hanno indicato la presenza di 188 campioni positivi per *E. coli*. Tra i ceppi isolati, 57 sono risultati positivi alla ricerca di fattori di virulenza, in funzione dei quali 4 ceppi (2%) sono stati identificati come *E. coli* Enterotossici (ETEC), 13 (7%) come *E. coli* produttori di tossine Shiga (STEC) e 40 (21%) come *E. coli* Necrotossici (NTEC) (Tabella 4). Una percentuale considerevole di isolati (70%) è risultata negativa alla ricerca dei diversi fattori di virulenza in esame, rientrando probabilmente a far parte della naturale microflora intesti-

Tabella 3 - Percentuali di associazione degli agenti eziologici di gastroenterite nel vitello bufalino.

	Percentuali di associazione (%)							
	CRY	GIA	EIM	RV	CV	SALM	ECO	CP
CRY	48	0	2	7	2	14	14	21
GIA	0	57	0	0	0	0	43	29
EIM	10	0	40	10	0	20	30	10
RV	18	0	6	18	6	24	35	41
CV	10	0	0	10	60	20	0	10
SALM	12	0	4	8	4	49	16	14
ECO	11	6	6	11	0	15	44	22
CP	13	3	1	10	1	10	17	59

CRY: *Cryptosporidium* spp.; GIA: *Giardia* spp.; EIM: *Eimeria* spp.; RV: Rotavirus; CV: Coronavirus; SALM: *Salmonella* spp.; ECO: *E. coli* patogeni; CP: *C. perfringens*.

Tabella 4 - Patotipi di *E. coli* isolati da vitelli bufalini in corso di gastroenterite.

Patotipo	Fattori di virulenza	N. isolati	Frequenza (%)
ETEC	<i>lt</i>	3	1,6
	<i>st</i>	1	0,5
STEC	<i>stx1-eae</i>	4	2,1
	<i>stx1-eae-hly</i>	5	2,7
	<i>stx2-eae</i>	3	1,6
	<i>stx1-stx2-eae</i>	1	0,5
NTEC	<i>cnf-hly</i>	9	4,8
	<i>cnf-cdt-hly</i>	26	13,8
	<i>cnf-F17-hly</i>	1	0,5
	<i>cnf-cdt-F17-hly</i>	4	2,1
<i>E. coli</i>	–	131	69,8

nale degli animali. Tre ceppi ETEC sono risultati positivi alla ricerca del gene della tossina termolabile *lt*, mentre uno stipite è risultato positivo al gene della tossina termostabile *st*. Gli isolati STEC sono risultati tutti *stx* e intimina-positivi. In particolare, 9 isolati hanno evidenziato la presenza di *stx1*, 3 isolati di *stx2*, e 1 isolato sia di *stx1* che di *stx2*. Tra questi isolati, 5 (3%) hanno mostrato anche attività emolitica. I NTEC sono risultati il patotipo più frequentemente isolato (21%) nei vitelli bufalini affetti da diarrea. Tutti i ceppi NTEC hanno mostrato positività per il gene *cnf*. Tra gli isolati NTEC, 30 stipiti hanno dato risultato positivo alla ricerca del gene *cdt*, e 5 isolati hanno mostrato positività alla famiglia delle fimbrie F17. Tutti i NTEC bufalini hanno esibito anche attività emolitica, come spesso accade per i NTEC di origine umana o animale.

Caratterizzazione degli isolati di *Salmonella* spp.

Le analisi per la ricerca di *Salmonella* spp. hanno individuato 49 campioni positivi. Tra i ceppi isolati, sono state identificate diverse sottospecie di *S. enterica*; quelle più frequenti sono risultate Typhimurium (13), Muenster (5) e Give (5). Gli altri sierotipi identificati sono stati: 4 Derby, 3 Bovismorbificans, 3 Newport, 3 Typhimurium monofasiche (B:4,12:i:-), 1 Blockley, 1 Meleagridis, 1 Umbilo, 1 Altona, 1 Bredeney, 1 Enterica (-;i:1,2), 1 Gaminara, 1 Haardt, 1 Hadar, 1 Isangi, 1 Kottbus, 1 Muenchen, 1 *S. sub. II salamae* (S:41:z:-). I risultati della fagotipizzazione degli isolati di *S. Typhimurium* indicano una distribuzione variabile dei fagotipi, identificando 9 diversi profili di suscettibilità fagica, ovvero 1 DT1, 1 DT20, 2 DT104, 2 DT110, 1 DT194, 1 DT208, 2 U302, 2 RDNC (reazione non conforme allo schema) e 1 NT (non tipizzabile).

Tabella 5 - Caratterizzazione molecolare degli isolati di *Clostridium perfringens* in riferimento alla produzione di tossine.

<i>C. perfringens</i> Tossine	N. isolati	Frequenza (%)
CP α	56	81
CP α -CP β 2	8	12
CP α -CP β 2-CPE	2	3
–	3	4

Salmonella spp. nel 51% dei casi è stata isolata contestualmente ad almeno uno degli altri patogeni ricercati in questo studio (Tabella 3). Da notare in particolare che nessun ceppo di *E. coli* patogeno è stato isolato in associazione con *S. Typhimurium*.

Tra i ceppi di *Salmonella* spp. isolati non in associazione con altri patogeni, rientrano non soltanto 9 ceppi di *S. Typhimurium*, ma anche salmonelle cosiddette minori, quali 4 *S. Muenster*, 3 *S. Give*, 2 *S. Newport*, 2 *S. Typhimurium* monofasica (B:4,12:i:-), 1 *S. Meleagridis*, 1 *S. Umbilo*, 1 *S. Bovismorbificans*, 1 *S. sub. II salamae* (S:41:z:-).

Caratterizzazione degli isolati di *C. perfringens*

Le analisi molecolari condotte sugli isolati di *C. perfringens* sono state mirate alla tipizzazione delle tossine eventualmente prodotte. Per ogni ceppo sono state ricercate le tossine alfa, beta, beta2, epsilon, iota e l'enterotossina E. Nel 96% dei casi i ceppi sono risultati produttori di tossine. In particolare, come mostrato in Tabella 5, tutti i ceppi tossinogeni sono risultati positivi alla ricerca della tossina alfa (CP α), 8 isolati (12%) hanno mostrato la presenza sia del gene della tossina alfa che della tossina beta2 (CP α -CP β 2), e 2 isolati (3%) sono risultati positivi ai geni per le tossine alfa, beta2 ed enterotossina E (CP α -CP β 2-CPE).

Profili di suscettibilità antimicrobica

Tutti i ceppi di *E. coli* patogeni sono stati testati per la sensibilità a 16 antibiotici. I ceppi di *E. coli* hanno mostrato percentuali di resistenza elevate, in particolare nei confronti di lincomicina (MY) (98%) e penicillina (PG) (93%), mentre percentuali di resistenza più basse sono state osservate per gentamicina (GN) e colistina solfato (CT) con valori del 26% e 9%, rispettivamente (Tabella 6). Gli isolati di *E. coli* patogeni hanno mostrato profili di multi-antibiotico-resistenza estremamente variegati, con combinazioni di resistenze agli antibiotici quasi tutte diverse fra loro. Nell'88% dei casi, infatti, hanno esibito resistenza ad almeno 4 antibiotici diversi; in particolare, il 35% degli isolati è risultato resistente ad almeno 10 molecole antibiotiche, e di questi un isolato ha esibito 14 diverse resistenze (dati non mostrati). Nessun ceppo di *E. coli* ha mostrato un profilo di suscettibilità totale agli antibiotici testati.

Tabella 6 - Profili di antibiotico resistenza dei ceppi di *E. coli* isolati da vitelli bufalini in corso di gastroenterite.

%	Ana	Amc	Amcl	Amp	Apr	Ct	Eno	Flu	Gn	My	Mafl	N	Ot	Pg	Sxt	Te
R	39	58	68	40	28	9	37	30	26	98	30	42	72	93	44	72
S	61	42	32	60	72	91	63	70	74	2	70	58	28	7	56	28

R = resistente; S = suscettibile

Tabella 7 - Profili di multi-antibiotico-resistenza dei ceppi di *Salmonella* spp. isolati da vitelli bufalini in corso di gastroenterite.

Profilo di antibiotico-resistenza	N. isolati	N. isolati <i>S. Typhimurium</i>
ana-amp-clo-str-sul-te-amcl	2	1
clo-kan-str-sul-te-sxt	1	
amp-sul-te-sxt-amcl-cf	1	
ana-kan-str-te	1	
str-sul-te-sxt	1	
amp-sul-te-sxt	3	3
amp-str-sul-te	3	2*
str-sul-te	2	1*
Meno di 3 resistenze/suscettibilità totale	35	6
*Include un ceppo con fagotipo DT104.		

Per quanto riguarda i ceppi di *Salmonella* spp., i tassi di resistenza più elevati sono stati riscontrati nei confronti di sulfonamidi (SUL) e tetraciclina (TE), con valori del 44% e 33%, rispettivamente, mentre suscettibilità totali sono state registrate nei confronti di cefotaxime (CEF), ciprofloxacina (CIP), colistina solfato (CT), enrofloxacin (ENO) e ceftazidime (CAZ) (dati non mostrati). La Tabella 7 mostra i profili di multi-antibiotico resistenza esibiti dagli isolati di *Salmonella* spp. in esame. Come si può notare, il 24% degli isolati ha esibito resistenza ad almeno 4 molecole antibiotiche diverse. In particolare, i due ceppi di *S. Typhimurium* DT104 hanno esibito i profili str-sul-te e amp-str-sul-te, rispettivamente. Gli altri isolati di *S. Typhimurium* hanno mostrato profili variabili, da un numero di 7 resistenze diverse (1 isolato) a suscettibilità totali alle molecole testate (3 isolati). Da notare che numerosi profili di multi-antibiotico resistenza sono stati riscontrati in isolati di *Salmonella* non *Typhimurium* (Tabella 5).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio consentono di definire alcuni aspetti delle gastroenteriti nel vitello bufalino. Infatti, la diarrea è risultata caratterizzata dalla presenza, talvolta contemporanea, di più agenti eziologici. In particolare, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. e *C. perfringens* sono stati identificati quali principali patogeni responsabili di sindrome gastroenterica in vitelli nel primo mese di vita.

C. perfringens è risultato il patogeno isolato con maggiore frequenza (28% dei casi), sia da solo che in associazione con altri patogeni. La tossina alfa è la principale tossina letale prodotta da questo microrganismo, e causa la lisi delle membrane di molti tipi cellulari. Insieme a questa, l'enterotossina e la tossina beta2 sono quelle che svolgono il ruolo principale nell'induzione di sindromi severe, e sono state associate a gastroenterite in diverse specie animali, quali bovini, suini e cavalli⁶. Analogamente, la presenza di clostridi produttori di alfa tossine è risultata significativa anche nel bufalo, con una frequenza di isolamento pari al 96% dei clostridi totali.

Gli *E. coli* patogeni sono risultati anch'essi piuttosto frequenti (23%). La caratterizzazione molecolare ha evidenziato i seguenti patotipi: ETEC (2%), STEC (7%) e NTEC (21%). In particolare, a differenza della specie bovina, nel vitello bufali-

no i ceppi ETEC sono stati rinvenuti piuttosto raramente. Ceppi STEC sono stati isolati nel 7% dei casi. La maggiore frequenza della tossina Stx1 rispetto alla Stx2 in ceppi *eae*-positivi è invece in accordo con quanto noto per la specie bovina, per la quale la Stx1 è spesso associata con ceppi *eae*-positivi e il gene *eae* è più frequente in ceppi STEC isolati da vitelli piuttosto che da soggetti adulti¹³. I ceppi NTEC sono risultati i più frequenti nei vitelli bufalini affetti da gastroenterite (isolati nel 21% dei casi), e questo risultato è in accordo con dati riportati in letteratura relativi alla presenza di ceppi CNF-positivi sia in vitelli sani che diarroici¹⁴. La presenza diffusa di ceppi NTEC in vitelli bufalini e l'elevato numero dei fattori di virulenza espressi, evidenzia il potere patogeno di questo patotipo. Il potenziale patogeno di tutti i patotipi riscontrati in questo studio assume poi un peso ancora maggiore in relazione alla diffusissima presenza di resistenze multiple agli antibiotici (88% degli isolati di *E. coli* patogeni). Una tale frequenza risulta estremamente preoccupante in relazione alla possibilità di diffusione dell'antibiotico-resistenza, mediante trasferimento orizzontale del carattere ad altre specie microbiche, anche patogene.

Salmonella spp. ha esibito una prevalenza significativa (20%), maggiore rispetto a quella riportata in passato per i vitelli bufalini (11%)¹⁵. La caratterizzazione fenotipica degli isolati di *Salmonella* spp. ha mostrato una distribuzione estremamente variabile dei sierotipi in questa specie animale, con una prevalenza di *S. Typhimurium* (26%), *S. Muenster* (10%) e *S. Give* (10%). I ceppi di *S. Typhimurium* hanno inoltre esibito una grande variabilità anche nella suscettibilità fagica. Il fagotipo DT104, che è spesso stato associato a ceppi dotati di resistenze multiple agli antibiotici con accertato potere zoonosico, non sembra essere molto diffuso nel bufalo. Oltretutto, nell'ambito dei profili di antibiotico resistenza, i ceppi DT104 isolati in questo studio hanno esibito un minor numero di resistenze rispetto non solo ad altri fagotipi, ma anche sierotipi non *Typhimurium*. Questi dati confermano l'assenza di un sierotipo specificamente adattato al bufalo¹ e pongono in evidenza il potenziale patogeno anche di salmonelle cosiddette minori. È interessante sottolineare la presenza in vitelli bufalini affetti da gastroenterite di ceppi di *S. Typhimurium* monofasica (B:4,12:i:-). Questi ceppi sono ormai diventati emergenti, e la loro presenza si sta diffondendo in animali da allevamento, in animali da compagnia nonché nell'uomo. Un recente documento EFSA¹⁶ considera infatti il rischio associato a questi ceppi paragonabile a quello determinato da *S. Typhimurium* nel causare ampie epidemie di infezione negli animali e nell'uomo.

La presenza di *Cryptosporidium* spp. (17%) è risultata paragonabile ai valori riportati in letteratura (14,19%)², a conferma che tale parassita può incidere grandemente in termini di numero di casi e costi da sostenere per la relativa terapia. Risulta pertanto di fondamentale importanza il controllo dei principali fattori di rischio che ne favoriscono la diffusione, quali la pavimentazione dell'azienda zootecnica e la fonte di approvvigionamento dell'acqua². Altri parassiti quali *Giardia* spp. ed *Eimeria* spp. sembrano essere poco diffusi, e questo dato, soprattutto per quanto riguarda *Eimeria* spp., potrebbe essere legato all'età dei soggetti investigati.

Infine, Coronavirus e Rotavirus sono stati identificati con frequenze decisamente più basse rispetto agli agenti batterici. Studi recenti^{3,17} sottolineano però l'importanza e il potere patogeno di questi agenti nell'allevamento bufalino, e riportano l'esistenza di ceppi specificamente adattati al bufalo.

CONCLUSIONI

I risultati riportati in questo studio confermano l'ampia e variegata presenza di agenti eziologici in vitelli bufalini affetti da gastroenterite. La multifattorialità della diarrea nel vitello impone pertanto di effettuare un'indagine su più soggetti della stessa azienda, in modo da ottenere un quadro completo dei patogeni presenti in allevamento ai fini di una corretta diagnosi e di un'efficace terapia. Quest'ultima non può non tener conto dell'antibiotico-resistenza mostrata in particolar modo da *E. coli* e, in minor misura, da *Salmonella* spp.

La diffusa presenza di patogeni, la capacità di resistenza agli antimicrobici, nonché la capacità di sopravvivenza ambientale di molti degli agenti eziologici studiati portano a concludere che occorre investire molto in termini di prevenzione. Questa deve basarsi sull'impiego di idonee procedure di pulizia, igiene e disinfezione ambientale, nonché sull'adozione della tecnica del "tutto pieno/tutto vuoto". Inoltre, di fondamentale importanza risulta la profilassi immunizzante basata soprattutto sull'utilizzo di specifici vaccini stabulogeni, data la peculiarità di molti degli agenti patogeni messi in evidenza. Infine, considerata la valenza zoonotica di alcuni di essi, l'applicazione di efficaci misure di biocontrollo determina un indubbio vantaggio in termini di sanità pubblica conseguente alla riduzione del rischio di contaminazione dei prodotti di filiera e dell'ambiente di allevamento.

■ Infectious gastroenteritis in water buffalo calves: identification and characterization of the major aetiological agents in herds of the Campania region

SUMMARY

The present study represents a survey of the infectious aetiological agents responsible for gastroenteritis in water buffalo calves within the first month of life. The faeces from 248 diarrhoeic calves were investigated for the presence of the pathogens *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Eimeria* spp. *C. perfringens* resulted the most frequent (28%) pathogen. Pathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. were isolated in the 23%, 20% and 17% of cases, respectively. Rotavirus, Coronavirus, *Eimeria* spp. and *Giardia* spp. were detected in the 7%, 4%, 4% and 3% of cases, respectively. The *E. coli* strains were characterized for the presence of the main virulence factors (*lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *eae*, *cdt*, *cnf*, *F17*) and for haemolytic activity. The strains were therefore classified as ETEC (2%), STEC (7%) and NTEC (21%). The serotyping of the *Salmonella* spp. isolates displayed an elevated number of *S. enterica* subspecies, mainly Typhimurium (26%), Muenster (10%) and Give (10%). The 13 *S. Typhimurium* isolates were characterized for phage susceptibility and exhibited 9 different phage types. The isolates of *C. perfringens* were characterized for the presence of genes coding for the major toxins (alpha, beta, beta2, iota, epsilon and enterotoxin E). The 81% of the strains was positive to the gene coding for toxin α , 12% of the isolates were positive to both toxin α and toxin β 2, 3% of the isolates were positive to toxin α ,

toxin β 2 and enterotoxin E. The *E. coli* and *Salmonella* isolates were further characterized for the resistance to 16 antibiotics, and exhibited high levels of multi-resistance. The results reported in this study confirm the wide and variegated presence of aetiological agents in water buffalo calves affected by gastroenteritis and underline the broad presence of antibiotic-resistance.

KEY WORDS

Infectious gastroenteritis, water buffalo calf, epidemiology.

Bibliografia

1. Fagiolo A., Roncoroni C., Lai O., Borghese A. (2005) Buffalo pathologies. In: Buffalo Production and Research, Ed. Borghese, A., 249-296, FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research Network on Buffalo, Rome.
2. El-Khodery S.A., Osman S.A. (2008) Cryptosporidiosis in buffalo calves (*Bubalus bubalis*): prevalence and potential risk factors. *Trop Anim Health Prod* 40: 419-426.
3. Pisanelli G., Martella V., Pagnini U., De Martino L., Lorusso E., Iovane G., Buonavoglia C. (2005) Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes in buffalo group A rotaviruses isolated in Southern Italy. *Vet Microbiol* 110: 1-6.
4. Borriello G., Lucibelli M.G., De Carlo E., Auriemma C., Cozza D., Ascione G., Scognamiglio F., Iovane G., Galiero G. (2012) Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci*, 93: 18-22.
5. Quinn P.J., Markey B., Leonard F.C., FitzPatrick E.S., Fanning S., Hargigan P.J. (2011) *Veterinary microbiology and Microbial diseases*, 2nd edition, 143-156, Wiley Blackwell West Sussex, UK.
6. Gurjar A.A., Hegde N.V., Love B.C., Jayarao B.M. (2008) Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Mol Cell Probes*, 22: 90-95.
7. Stephensen C.B., Casebolt D.B., Gangopadhyay N.N. (1999) Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res*, 60: 181-189.
8. Logan C., O'Leary J.J., O'Sullivan N. (2006) Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol*, 44: 3189-3195.
9. Hendrix C.M. (2007) Internal parasites In: *Laboratory procedures for veterinary technicians*, Eds. Hendrix C.M. and Sirois M., 5th edition, 181-229, Elsevier, St. Louis.
10. UNI EN ISO 6579 (2002), Annex D "Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from primary production stage".
11. Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition, 1-166, Paris.
12. CLSI (2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd edition Approved Standard. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Sandhu K.S., Clarke R.C., McFadden K., Brouwer A., Louie M., Wilson J., Lior H., Gyles C.L. (1996) Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxinogenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol Infect* 116: 1-7.
14. Blanco M., Blanco J., Blanco J.E., Ramos J. (1993) Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res* 54: 1446-1451.
15. Adlakha S.C., Sharma S.N. (1992) Infectious diseases In: *World Animal Science C6*, Buffalo Productions. Eds Tulloh N.M. and Holmes, J.H.G. 271-303, Elsevier, Parkville, Victoria.
16. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2010) Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella* Typhimurium-like" strains. *EFSA J*; 8: 1826-1873.
17. Decaro N., Cirone F., Mari V., Nava D., Tinelli A., Elia G., Di Sarno A., Martella V., Colaianni M.L., Aprea G., Tempesta M., Buonavoglia C. (2010) Characterisation of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Vet Microbiol* 145: 245-251.



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
del Mezzogiorno



Università degli Studi di Napoli
Federico II



SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA

XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Sorrento (NA)
Hotel Conca Park

24 - 26 Ottobre 2012

VOLUME DEGLI ATTI

L'IMMUNITÀ INNATA NELLA BUFALA MEDITERRANEA: STUDIO SUL RUOLO DEI RECETTORI TOLL-LIKE 2, 4 E 9 NEI CONFRONTI DI MYCOBACTERIUM BOVIS

Alfano F.^[1], Peletto S.^[3], Lucibelli M.G.^[1], Borriello G.^[1], Tarantino M.^[2], Pasquali P.^[2], Guarino A.^[1], Acutis P.L.^[3], Galiero G.^[1]

Keywords: tubercolosi, *Bubalus bubalis*, SNP

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno ~ Portici (Napoli),

^[2]Istituto Superiore di Sanità ~ Roma,

^[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta ~ Torino

SUMMARY: Toll-like receptors are membrane proteins that play a key role in innate immunity, by recognizing pathogens and subsequently activating appropriate responses. Pathogens express several signal molecules, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are essential for survival and pathogenicity. Recognition of PAMPs triggers an array of anti-microbial immune responses through the induction of various inflammatory cytokines. The objective of this work was to perform a case-control study to characterize the distribution of polymorphisms in three candidate genes (toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, toll-like receptor 9) related to the immune function and to test their role as potential risk factors for tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*). The statistical analysis demonstrated significant differences in allelic frequencies between cases and controls, indicating an association between infection and three polymorphisms.

INTRODUZIONE: L'immunità innata svolge un ruolo essenziale nella difesa dell'ospite da microrganismi patogeni, entrando in azione subito dopo l'inizio dell'infezione. A differenza dell'immunità acquisita, non fornisce una risposta specifica, ma si attiva per la distruzione dei patogeni in seguito al riconoscimento di specifici PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), strutture molecolari conservate e tipiche di microrganismi patogeni (1, 2). Tale riconoscimento avviene grazie ad un sofisticato sistema di recettori, i recettori Toll-like (TLRs). Il legame tra il TLR e il suo ligando determina un segnale a cascata all'interno della cellula che produce un aumento dei fattori di trascrizione nucleare, responsabile a sua volta della produzione di specifiche citochine coinvolte nell'attivazione della risposta immunitaria (8). Si è visto che mutazioni nelle sequenze nucleotidiche che codificano per queste proteine sono spesso responsabili di variazioni nella risposta verso i patogeni (3, 5, 6). Negli allevamenti bufalini della Campania sono presenti ancora diverse importanti patologie infettive, come la tubercolosi, per cui il bufalo può rappresentare un ottimo modello animale nel quale condurre studi sull'immunità innata. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati: determinare l'eventuale presenza di polimorfismi genetici nei geni toll-like receptors del bufalo (*Bubalus bubalis*) ed analizzare la potenziale associazione di questi con la suscettibilità/resistenza genetica alla tubercolosi mediante studi caso-controllo. Sono stati selezionati tre geni oggetto del nostro studio: *tlr2* (recettore del peptidoglicano e lipoproteine), *tlr4* (recettore LPS) e *tlr9* (recettore di DNA batterico/non self).

MATERIALI E METODI: I campioni analizzati derivano da 174 animali provenienti da 22 allevamenti presenti nella regione Campania, di cui 54 risultati positivi all'esame batteriologico per la ricerca del *Mycobacterium bovis* (casi) e 120 risultati negativi al test intradermico (controlli) e provenienti

dagli stessi allevamenti dei casi. L'età minima dei controlli era di cinque anni, in modo da selezionare animali esposti al micobatterio, ma risultati sempre negativi al test. Il DNA è stato estratto con il kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Il disegno dei primer per l'amplificazione dell'intera coding sequence dei tre geni da analizzare è stato effettuato con il programma "Primer3". Per ogni toll-like receptor sono state generate le coppie di primer riportate nella tabella 1. Gli ampliconi sono stati sequenziati bidirezionalmente utilizzando il kit Big Dye Terminator cycle sequencing kit v.1.1, Applied Biosystems e lo strumento per elettroforesi capillare ABI Prism 310 Applied Biosystems.

Le sequenze ottenute sono state confrontate fra loro e con sequenze di riferimento presenti in GenBank (*tlr2*: HM756161; *tlr4*: HM469969; *tlr9*: HQ242778). L'allineamento delle sequenze e l'identificazione dei polimorfismi è stato effettuato utilizzando il software SEQMAN (DNASTAR Inc) e Bioedit (Tom Hall). Si è proceduto, successivamente alla ricostruzione degli aplotipi mediante il programma PHASE (8). La distribuzione degli alleli e degli aplotipi rilevati è stata analizzata mediante uno studio caso-controllo, al fine di verificare eventuali correlazioni significative con la malattia tubercolare.

Locus	Sequenza (5' → 3')	Ta PCR (°C)
TLR2 A	Fw: GTGGTAGTTTGAGCATCTTAA	47
	Rw: GTCCTGGCCCTCTCGATATTC	
TLR2 B	Fw: CTGTCCAACATGAGATCACCT	49
	Rw: AATTCTGTCCAACTGTATATTC	
TLR2 C	Fw: CTGTCCAACATGAGATCACCT	49
	Rw: AATTCTGTCCAACTGTATATTC	
TLR2 D	Fw: GTTCAGGTCCTTTATGTCTTG	47
	Rw: ATGGGTACAGTCATCAAACTCT	
TLR2 E	Fw: ACTACCGCTGTACTCTCCCTC	55
	Rw: GACCACCACCAAGCAAGACT	
TLR2 F	Fw: CTCCTTCTCTGAATGCCACA	47
	Rw: AAAGTATGGAGCTTCAGCA	
TLR4 A	Fw: GTGTGGAGACCTAGATGACTGG	50
	Rw: GTACGCTATCGGAATTGTTC	
TLR4 B	Fw: CTACCAAGCCTTCAGTATCTAG	47
	Rw: GGCATGTCTCCATATCTAAAG	
TLR4 C	Fw: TCAGGAACGCCACTTGTGAGCT	55
	Rw: TGAACACGCCCTGCTCCATCT	
TLR9 A	Fw: CCAGCCTCTCTTAATCTCC	54
	Rw: CGGAACCAATCTTCTCTAGTT	
TLR9 B	Fw: CCTGACACCTTCAGTCACCT	55
	Rw: GCGGGTAAACATCTCTTGCT	
TLR9 C	Fw: CGTCAGCTCAAGGACTTCA	56
	Rw: AGGGGTGTGAGATGTTCTC	
TLR9 D	Fw: GGGAGACCTCTATCTGCTTT	56
	Rw: CGCTCAGCTCTAGGATTTTC	

Tabella 1. Elenco dei primer utilizzati per l'amplificazione della sequenza codificante dei geni *tlr2*, *4* e *9*.

RISULTATI E CONCLUSIONI: L'analisi effettuata sulle sequenze dei geni dei *tlrs* bufalini ha permesso di identificare 18 nuovi SNP (single nucleotide polymorphism) nel *tlr2* (Tab. 2) e 9 SNP nel *tlr4* (Tab. 3) tutti non presenti in banca dati (GenBank HM756161; HM469969). Nel *tlr9* non sono stati rilevati polimorfismi.

Lo studio caso-controllo effettuato sui polimorfismi identificati nei due geni ha evidenziato la presenza di associazione per tre di questi con l'infezione tubercolare. Per quanto riguarda il *tlr2* (Tab. 4), al locus polimorfico 381 A>G, il genotipo GG è risultato associato alla suscettibilità alla malattia (O.R. 52,25 I.C. 6,75 + 404,57), mentre il genotipo eterozigote AG è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi (O.R. 0,06 I.C. 0,01 + 0,25). Nel locus polimorfico 2064 T>C il genotipo TT è risultato associato alla suscettibilità alla malattia (O.R. 48,5 I.C. 10,88 + 216,26), mentre il genotipo omozigote opposto CC (O.R. 0,04 I.C. 0,01 + 0,13), è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi, costituendo un fattore protettivo nei confronti di tale patologia. La ricostruzione aplo-tipica eseguita (Tab. 5), che determina la combinazione degli alleli sul singolo cromosoma, ha messo in evidenza la presenza di un aplotipo di *tlr2* associato alla resistenza alla patologia. Nel *tlr4* (Tab. 6) il genotipo CC del locus polimorfico 672 A>C è risultato associato alla resistenza alla tubercolosi (O.R. 0,28 I.C. 0,10 + 0,76), ma in questo caso nessuno degli aplotipi ottenuti ha mostrato un'associazione significativa (Tab. 7).

Un aspetto interessante risiede nel fatto che tutti gli SNP per cui l'analisi statistico-epidemiologica ha verificato un'associazione alla malattia siano SNP sinonimi.

Sebbene questo tipo di mutazioni non impattino di norma sulla suscettibilità/resistenza alla malattia, essendo influenti sulla composizione aminoacidica della proteina codificata, diversi studi (4, 7) hanno dimostrato che anche questi polimorfismi possono avere effetti su alcuni dei più importanti processi che regolano la sintesi delle proteine e di conseguenza sul fenotipo. Ad oggi si stima siano circa 50 le malattie umane causate del tutto o in parte da mutazioni sinonime, ma è stato dimostrato anche un loro ruolo nella resistenza ad alcune patologie. Per quanto riguarda i meccanismi in cui queste mutazioni sono coinvolte, si è visto che possono interferire con la sintesi proteica, essendo alcune triplette tradotte preferenzialmente, lo splicing, la stabilità dell'mRNA, l'affinità per le proteine regolatrici.

Un'ipotesi alternativa al coinvolgimento diretto di queste mutazioni potrebbe essere che esse siano in linkage con altre mutazioni funzionali nei *tlr*, non ancora identificate.

I dati riportati in questo studio indicano che i polimorfismi dei geni coinvolti nella risposta immunitaria alla tubercolosi nel bufalo (*Bubalus bubalis*), possono avere un ruolo nella risposta dell'ospite a questa patologia. Altri studi saranno necessari per comprendere il meccanismo d'azione dei polimorfismi identificati.

SNPs	posizione		sostituzione aminoacidica
	coding sequence	proteina	aa
C>T	42	14	/
C>T	53	18	M/T
C>T	108	36	/
G>A	153	51	/
C>T	156	52	/
T>C	374	125	A/V
A>G	381	127	/
GC>CT	482/483	161	S/T
G>C	519	173	/
A>G	1034	345	S/N
T>C	1375	459	/
C>T	1407	469	/
G>A	1650	550	/
A>G	1678	560	A/T
C>T	1707	569	/
C>T	1731	577	/
C>T	1740	580	/
T>C	2064	688	/

Tabella 2. Posizione degli SNPs sul DNA del *tlr2* (la posizione riportata è relativa alla prima base del primo codone della sequenza codificante), corrispondenza con la posizione dell'aminoacido codificato nella proteina ed eventuale sostituzione aminoacidica.

SNPs	posizione		sostituzione aminoacidica
	coding sequence	proteina	aa
A>C	572	191	Y/S
A>G	572	191	Y/C
C>T	574	192	Q/W
A>G	575	192	Q/W
T>G	576	192	/
G>A	577	193	E/K
A>G	579	193	/
G>A	647	215	/
G>A	662	220	/
A>C	672	224	/

Tabella 3. Posizione degli SNPs sul DNA del *tlr4* (la posizione riportata è relativa alla prima base del primo codone della sequenza codificante), corrispondenza con la posizione dell'aminoacido codificato nella proteina ed eventuale sostituzione aminoacidica.

	Genotipo	O.R.	I.C. 95%	p value
42-C>T	C/C	1,13	0,57 + 2,29	0,84
	T/T	1,83	0,25 + 13,38	0,61
	C/T	0,81	0,41 + 1,63	0,69
53-C>T	C/C	2,15	0,96 + 4,82	0,08
	T/T	0,89	0,43 + 1,84	0,85
	C/T	0,67	0,35 + 1,30	0,20
108-C>T	C/C	2,15	0,96 + 4,82	0,09
	T/T	0,85	0,41 + 1,75	0,79
	C/T	0,7	0,36 + 1,35	0,36
153-G>A	G/G	1,96	0,86 + 4,4	0,15
	A/A	0,85	0,41 + 1,75	0,79
	G/A	0,75	0,39 + 1,45	0,48
156-C>T	C/C	1,15	0,59 + 2,26	0,80
	T/T	3,77	0,33 + 42,59	0,55
	C/T	0,77	0,39 + 1,53	0,57
374-T>C	T/T	2,86	0,46 + 17,63	0,34
	C/C	0,63	0,33 + 1,23	0,18
	T/C	1,38	0,71 + 2,69	0,39
381-A>G	A/A	1,13	0,57 + 2,21	0,86
	G/G	52,25	6,75 + 404,57	0,00
	A/G	0,08	0,01 + 0,25	0,00
482/483-GC>CT	GC/GC	1,03	0,52 + 2,00	1,00
	CT/CT	3,77	0,33 + 42,59	0,28
	GC/CT	0,87	0,44 + 1,72	0,73
519-G>C	G/G	0,91	0,48 + 1,74	0,92
	C/C	1,87	0,45 + 7,77	0,45
	G/C	0,97	0,50 + 1,86	1,00
1034-A>G	A/A	1,96	0,86 + 4,42	0,13
	G/G	0,85	0,41 + 1,86	0,71
	A/G	0,75	0,39 + 1,44	0,41
1375-T>C	T/T	1,4	0,30 + 6,49	0,69
	C/C	0,69	0,36 + 1,33	0,34
	T/C	1,38	0,71 + 2,67	0,43
1407-C>T	C/C	0,84	0,43 + 1,65	0,74
	T/T	3,74	0,33 + 42,20	0,55
	C/T	1,06	0,54 + 2,10	1,00
1650-G>A	G/G	1,95	0,99 + 3,86	0,07
	A/A	0,1	0,01 + 1,74	0,10
	G/A	0,7	0,35 + 1,40	0,40
1678-A>G	A/A	2,83	0,46 + 17,47	0,34
	G/G	0,67	0,35 + 1,30	0,24
	A/G	1,3	0,67 + 2,52	0,49
1707-C>T	C/C	1,93	0,85 + 4,37	0,16
	T/T	0,84	0,41 + 1,73	0,76
	C/T	0,76	0,40 + 1,47	0,52
1731-C>T	C/C	1,08	0,56 + 2,10	1,00
	T/T	3,74	0,33 + 42,20	0,55
	C/T	3,74	0,33 + 42,20	0,55
1740-C>T	C/C	1,17	0,60 + 2,28	0,77
	T/T	3,74	0,33 + 42,20	0,55
	C/T	0,76	0,38 + 1,50	0,54
2064-T>C	T/T	48,5	10,88 + 216,26	0,00
	C/C	0,04	0,01 + 0,13	0,00
	T/C	1,35	0,69 + 2,63	0,47

Tabella 4. Distribuzioni dei polimorfismi identificati nel *tlr2*, odds ratio, intervallo di confidenza e P value.

Aplotipi	Freq.	Freq. contr.	S.E.	Freq. casi	S.E.	controlli	casi	pvalue	O.R.	I.C. 95%
CCCGCTAGCGATCGACCT	0,219	0,206	0,002	0,245	0,004	21	14	0,48	1,24	0,72 ÷ 2,15
CCCGTCGCTGACTGGCTTC	0,019	0,015	0,002	0,027	0,000	2	2	0,67	1,86	0,37 ÷ 9,38
CTTACCAGCGGCCGGTCCC	0,044	0,035	0,002	0,063	0,000	4	4	0,26	1,9	0,65 ÷ 5,55
CTTACCAGCGGCCAGTCCC	0,198	0,234	0,004	0,134	0,000	24	7	0,04	0,51	0,27 ÷ 0,96
CTTACCAGCGGCCAGTCCC	0,022	0,020	0,002	0,027	0,000	2	2	0,7	1,39	0,31 ÷ 6,32
CTTACCAGCGGCCGGTCCC	0,258	0,257	0,004	0,263	0,000	26	15	0,89	1,06	0,63 ÷ 1,78
TCCGTCGCTGACTGGCTTC	0,178	0,189	0,001	0,161	0,000	19	9	0,55	0,82	0,44 ÷ 1,51

Tabella 5. Aplotipi relativi al *thr2*.

SNPs	Genotipo	p value	O.R.	I.C. 95%
572 C>A G	A/A	0,16	0,46	0,18 ÷ 1,16
	C/C	0,8	1,17	0,53 ÷ 2,58
	G/G	0,09	11,6	0,54 ÷ 245
	A/C	0,76	1,16	0,60 ÷ 2,22
	A/G	0,88	1,17	0,45 ÷ 3,01
	C/G	1	0,88	0,35 ÷ 2,21
574 C>T	C/C	0,54	0,75	0,37 ÷ 1,52
	T/T	0,32	3,58	0,58 ÷ 22,12
	C/T	1	1,09	0,52 ÷ 2,28
575 A>G	A/A	0,3	1,55	0,75 ÷ 3,22
	G/G	0,58	2,34	0,32 ÷ 17,10
	A/G	0,18	0,55	0,25 ÷ 2,19
576 T>G	G/G	0,09	0,38	0,13 ÷ 1,06
	T/T	0,72	1,19	0,61 ÷ 1,32
	G/T	0,43	1,36	0,71 ÷ 2,58
577 G>A	A/A	0,92	0,94	0,41 ÷ 2,14
	G/G	0,64	0,79	0,38 ÷ 1,62
	A/G	0,6	1,25	0,65 ÷ 2,37
579 A>G	A/A	0,38	0,68	0,33 ÷ 1,39
	G/G	0,71	1,25	0,57 ÷ 2,75
	A/G	0,71	1,18	0,62 ÷ 2,24
647 G>A	A/A	0,17	0,47	0,18 ÷ 1,22
	G/G	0,57	1,28	0,65 ÷ 2,50
	A/G	0,71	1,18	0,62 ÷ 2,24
662 G>A	A/A	0,07	0,36	0,13 ÷ 1,01
	G/G	0,5	1,33	0,68 ÷ 2,60
	A/G	0,55	1,27	0,67 ÷ 2,42
672 A>C	A/A	0,26	1,55	0,78 ÷ 3,06
	C/C	0,01	0,28	0,10 ÷ 0,76
	A/C	0,43	1,36	0,71 ÷ 2,58

Tabella 6. Distribuzioni dei polimorfismi identificati nel *thr4*, P value, odds ratio e intervallo di confidenza.

Aplotipi	Freq.	Freq. contr.	S.E.	Freq. casi	S.E.	controlli	casi	pvalue	O.R.	I.C. 95%
ACAGGAAAC	0,392	0,418	0,002	0,333	0,001	52	18	0,14	0,70	0,43 ÷ 1,12
CCATAGGGA	0,250	0,226	0,004	0,306	0,003	28	17	0,14	1,51	0,91 ÷ 2,50
CCGTAGGGA	0,142	0,143	0,003	0,138	0,003	18	7	1,00	0,95	0,50 ÷ 1,82
CCATAGGGC	0,013	0,015	0,004	0,009	0,001	2	1	1,00	0,56	0,06 ÷ 5,10
GTATGAAGA	0,012	0,018	0,004	0,000	0,000	2	0	0,67	0,25	0,01 ÷ 4,69
GTATGAGGA	0,117	0,018	0,004	0,000	0,000	2	0	0,67	0,25	0,01 ÷ 4,69

Tabella 7. Aplotipi relativi al *thr 4*.

- BIBLIOGRAFIA:** 1. Adams LG, Templeton JW. (1998). Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev Sci Tech.* 17(1):200-219.
2. Capparelli R, Alfano F, Amoroso MG, Borriello G, Fenizia D, Bianco A, Roperto S, Roperto F, Iannelli D. (2007). Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect Immun.* 75(2):988-96.
3. Cargill EJ, Womack JE. (2007). Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics.* 89:745-755.
4. Chamary JV, Hurst LD. (2009). The price of silent mutations. *Sci Am.* 300(6):46-53.
5. Kobayashi, K., Yuliwulandari, R., Yanai, H., Naka, I., Lien, L. T., Hang, N. T. L., Hijikata, M., Keicho, N. and Tokunaga, K. (2012). Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens*, 79: 190-197.
6. Mitra M, Taraphder S, Sonawane G S, and Verma A (2012). Nucleotide sequencing and SNP detection of Toll-like receptor-4 gene in Murrah Buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Scholarly Research Network*, vol 2012: 1-7 Art. ID 659513.
7. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE. (2003). Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem.* 278(29):26580-26588.
8. Stephens M., Smith N. J. and P. Donnelly (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.
9. Takeda K, Akira S (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 16: 3-9.

Identification of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor candidate genes associated with tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*)

Flora Alfano^{1§}, Simone Peletto², Maria Gabriella Lucibelli¹, Giorgia Borriello¹, Giovanna Urciuolo¹, Maria Grazia Maniaci², Michela Tarantino³, Amalia Barone⁴, Paolo Pasquali³, Pier Luigi Acutis², Giorgio Galiero¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute, 2, 80055 Portici, Italy;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148, 10154 Torino, Italy.

³Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Viale Regina Elena, 299, 00161, Roma, Italy.

⁴Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici, Italy

§Corresponding author

Email addresses:

FA: flora.alfano@cert.izsmportici.it

SP: simone.peletto@izsto.it

MGL: mariagabriella.lucibelli@cert.izsmportici.it

GB: giorgia.borriello@izsmportici.it

GU: giovanna.urciuolo@tiscali.it

MGM: mariagrazia.maniaci@izsto.it

MT: michela.tarantino@iss.it

AB: ambarone@unina.it

PP: paolo.pasquali@iss.it

PLA: pierluigi.acutis@izsto.it

GG: giorgio.galiero@cert.izsmportici.it

Abstract

Background Toll-like receptors play a key role in innate immunity by recognizing pathogens and activating appropriate responses. Pathogens express several signal molecules (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) essential for survival and pathogenicity. Recognition of PAMPs triggers an array of anti-microbial immune responses through the induction of various inflammatory cytokines. The objective of this work was to perform a case-control study to characterize the distribution of polymorphisms in three candidate genes (*toll-like receptor 2*, *toll-like receptor 4*, *toll-like receptor 9*) and to test their role as potential risk factors for tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*).

Results The case-control study included 174 subjects, 54 of which resulted positive to both intradermal TB test and *Mycobacterium bovis* isolation (cases) and 120 resulted negative to at least three consecutive intradermal TB tests. The statistical analysis indicated that six polymorphisms exhibited significant differences in allelic frequencies between cases and controls. Indeed, the GG and TT genotypes at *TLR2* 381 A>G and *TLR2* 2064 T>C loci, respectively, resulted significantly associated with susceptibility to bovine tuberculosis ($P < 0.001$, OR=52.25, 95% CI=6.75÷404.57, and $P < 0.001$, OR= 48.5, 95% CI=10.88÷216.26, respectively). Four polymorphisms resulted significantly associated with resistance to the disease, and included the AG and CC genotypes, at the *TLR2* 381 A>G and *TLR2* 2064 T>C loci, respectively, ($P < 0.001$, OR= 0.06, 95% CI= 0.01 to 0.25, and $P < 0.001$, OR=0.04, 95% CI=0.01÷0.13, respectively); the CC genotype at the *TLR4* 672 A>C locus ($P = 0.01$, OR= 0.28, 95% CI=0.10÷0.76), and the C/C genotype at the *TLR9* 2340 C>T locus ($P = 0.04$, OR=0.33, 95% CI=0.11÷0.92). Haplotype reconstruction of the *TLR2* gene revealed a haplotype (CTTACCAGCGGCCAGTCCC) associated with disease resistance ($P=0.04$, OR=0.51, 95% CI=0.27÷0.96), including both allelic variants associated with disease resistance.

Conclusions The work describes novel mutations in bubaline *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes and presents their association with *M. bovis* infection. These results will enhance our ability to determine the risk of developing the disease by improving the knowledge of the immune mechanisms involved in host response to mycobacterial infection, and will allow the creation of multiple layers of disease resistance in herds by selective breeding.

Keywords

Bubalus bubalis

TLRs

genetic resistance

case–control study

Background

Tuberculosis is a major zoonosis that causes serious economic losses in livestock industry. Among domestic ruminants, an economically important role, in many parts of the world and particularly in Southern Italy, is played by water buffalo (*Bubalus bubalis*). Milk from this animal species is used for the production of the worldwide famous “mozzarella di bufala” cheese, whose product specifications allow the use of raw milk [1]. It is therefore mandatory the use of milk collected from brucellosis- and tuberculosis-free herds. Tuberculosis in Southern Italy has not yet been eradicated (prevalence value of 0.7% in bovine and water buffalo herds in 2012), and there is an increase of new cases of the disease (incidence value of 0.65%) (data from the veterinary epidemiology monitoring field office, Istituto Zooprofilattico

Sperimentale del Mezzogiorno). The Italian National plan for tuberculosis control is based on a test-and-slaughter approach and does not allow vaccination. The genetic variation within the host may play a crucial role in the immunity to infections and resistance or susceptibility to disease, and selective breeding for disease-resistant genotypes might represent an emerging approach supporting disease control [2,3]. The role of genes in protection against bacterial infections also shown in water buffalo [4] prompted the search for polymorphisms conferring resistance to mycobacterial infection in this species.

Microbial infection initiates complex interactions between the pathogen and the host. Pathogens express several signal molecules, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are essential for survival and pathogenicity. Recognition of PAMPs triggers an array of anti-microbial immune responses through the induction of various inflammatory cytokines [5].

Toll-like receptors (*TLRs*) are reported to be involved in immune responses [6-8] and their polymorphisms have been associated with high susceptibility to mycobacteria, the causative agent of bovine tuberculosis [9-12]. *TLRs* are transmembrane proteins that play a key role in innate immunity by recognizing pathogens and subsequently activating appropriate responses. They are characterized by an extracellular N-terminal domain constituted by 16 to 28 leucine rich repeats (LRR) involved in ligand recognition [13], and an intracellular C-terminal domain known as the toll/IL-1 receptor (TIR) domain, required for the interaction and recruitment of various adaptor molecules to activate the downstream signalling pathways [14]. In water buffalo, each cell contains 25 chromosome pairs (*Bubalus bubalis* 2n=50) [15], and the *TLRs* 2 and 9 loci are localized on chromosomes 17 and 21, respectively, while the *TLR* 4 locus is located on chromosome 3 [16].

Toll-like receptors 2 and 4 mediate their effects by recognizing bacteria, including mycobacteria. Toll-like receptor 2 is sensitive to peptidoglycan and to lipoarabinomannan molecules present in the cell wall of these microorganisms. Toll-like receptor 4 is involved in bacterial lipopolysaccharide recognition [17], but its sensitivity to mycobacterial antigens has also been reported [18]. Toll-like receptor 9 is essential for responses to bacterial DNA and in particular to unmethylated CpG dinucleotides (CpG DNA) [19].

The aim of this study was (i) to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding sequence (CDS) of three candidate genes: *toll-like receptor 2* (*TLR* 2), *toll-like receptor 4* (*TLR* 4), *toll-like receptor 9* (*TLR* 9), (ii) to characterize the distribution of the detected polymorphisms and (iii) to perform a case-control study to test their role as potential risk factors for tuberculosis infection in water buffalo.

Results

Identification of SNPs.

The water buffalo *TLR2* and *TLR9* genes consist of two exons, while the *TLR4* consists of three exons. The analysis of the entire CDSs enabled us to identify 29 new SNPs, none of which was reported in GeneBank. Specifically, 18 were identified in *TLR2* (five non-synonymous and 13 synonymous), nine in *TLR4* (five non-synonymous and four synonymous), and two in *TLR9* (both synonymous). All the found SNPs were bi-allelic with the exception of a tri-allelic SNP (572 A>CG) found in *TLR4*. In addition we identified a dinucleotidic SNP (482/483 GC>CT) in *TLR2*. Table 1 shows all the SNPs, their positions in the CDS and the encoded protein codon.

Case-control study

Calculation of the allelic and genotypic frequencies, and application of the χ^2 test, revealed that both populations (cases and controls) conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium with regard to all the polymorphic loci ($P > 0.05$) of the *TLRs* 2, 4 and 9 genes.

For each detected SNP, the frequency distributions of each possible genotype in both groups of animals (cases and controls) was evaluated by calculating the Odds Ratio (OR) and applying the χ^2 test of independence. Within the 29 analysed polymorphic sites, four SNPs exhibited statistically significant differences in frequency distribution of one or more associated genotypes between cases and controls (Table 2). In particular, two SNPs were located in the *TLR2* gene (381 A>G and 2064 T>C), one SNP in *TLR4* (672 A>C) and one in *TLR9* (2340 C>T).

In the *TLR2* gene, the 381 A>G locus included the GG genotype exhibiting an OR of 52.25 (95% CI= 6.75 to 404.57) and a χ^2 test of independence with a significant P -value ($P < 0.001$), thus indicating a strict correlation between this genotype and susceptibility to tuberculosis. In the same polymorphic locus, a significant P -value ($P < 0.001$) and a significant OR (OR= 0.06, 95% CI= 0.01 to 0.25) were observed for the heterozygous A/G genotype. However, in this case, an OR value far below 1 indicates a likewise strong correlation with resistance to the disease. In the same gene, the homozygous T/T genotype at the 2064 T>C polymorphic locus, proved to be significantly associated with susceptibility to the disease ($P < 0.001$ and OR= 48.5, 95% CI= 10.88 to 216.26), while the homozygous C/C genotype was associated with disease resistance ($P < 0.001$ and OR 0.04, 95% CI =0.01 to 0.13).

For the *TLR4* gene, the CC genotype at the 672 A>C locus displayed a significant P -value ($P = 0.01$) and an OR lower than 1 (OR= 0.28, 95% CI =0.10 to 0.76), thus indicating a significant association with resistance to tuberculosis.

In the *TLR9* gene, the analysis revealed one polymorphic site (2340 C>T) including one genotype (C/C) associated with resistance to the disease ($P = 0.04$ and OR= 0.33, 95% CI = 0.11 to 0.92).

Haplotype reconstruction based on *TLR2* polymorphisms performed by *PHASE* software, generated 25 possible haplotypes, seven of which displayed a frequency greater than 0.01% in the whole sample. The software *PHASE* can reveal any significant imbalance in haplotype distribution between groups by performing a permutation test; the application of this analysis to the detected haplotypes revealed the presence of one haplotype (CTTACCAGCGGCCAGTCCC) associated with disease resistance ($P = 0.04$ and OR = 0.51, 95% CI= 0.27 to 0.96). This haplotype contained the two allelic variations that resulted associated with disease resistance.

In the *TLR4* gene, 34 haplotypes were observed in the two tested groups, six of which displayed a frequency greater than 0.01% in the whole population. None of the predicted haplotypes showed a significant association with resistance/susceptibility to tuberculosis.

Finally, four haplotypes were observed in the *TLR9* gene, none of which displayed a significant association with resistance/susceptibility to tuberculosis.

Discussion

The polymorphisms of single nucleotides constitute excellent genetic markers for various population studies, in that they can, for instance, reveal traces of natural selection. Moreover, it is now known that the contribution of genes to the incidence of or predisposition to diseases can be determined by comparing inter-individual genetic differences.

Each individual, to a greater or lesser degree than others, is genetically prone to develop certain diseases. In most cases, the susceptibility or resistance to a given pathology does not of course mean that the individual will necessarily be affected by the disease or remain

disease-free; it does, however, indicate a higher or lower risk than that of the general population. Indeed, the onset of symptoms is due to an interaction between genetic factors and environmental factors (stress, diet, etc). Nevertheless, cases have been described in which genetic factors are sufficient to determine the course of infection. In scrapie, for instance, which is a transmissible disease of sheep and goats caused by a prion, there are reports of genotypes that are defined as “resistant”, which are practically refractory to natural infection [20,21].

Our analysis of the water buffalo *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes enabled us to identify 29 SNPs. In the three genes, the 34% of the SNPs fell within the LRR protein domains, regions responsible for ligand recognition. This finding is in agreement with what has already been observed in *TLRs* genes of cattle, humans and mice [9,22].

The case-control study carried out on the identified polymorphisms revealed the presence of associations between some of these and the disease caused by *M. bovis*. Specifically, in *TLR2*, we observed a strong correlation between susceptibility to disease and two genotypes: G/G at locus 381 A>G (OR = 52.25, 95% CI = 6.75 to 404.57, $P < 0.001$) and T/T at locus 2064 T>C (OR= 48.5, 95% CI= 10.88 to 216.26, $P < 0.001$). By contrast, a likewise strong correlation was seen between resistance to tuberculosis and the A/G (OR= 0.06, 95% CI= 0.01 to 0.25, $P < 0.001$) and C/C (OR = 0.04, 95% CI = 0.01 to 0.13, $P < 0.001$) genotypes, when present at the same respective loci. Haplotype reconstruction enabled us to ascertain whether the interaction of the single alleles exerted an influence on the animal's response to the disease; indeed, this analysis revealed a haplotype that was associated with disease resistance (CTTACCAGCGGCCAGTCCC). This haplotype contained the two allelic variants which proved to be associated with disease resistance. However, as these variants are not exclusive of the associated haplotype, we may hypothesise that other loci exert a modulatory effect.

The study conducted on the polymorphisms identified in *TLR4* revealed the presence of a single genotype that was associated with resistance to tuberculosis: the C/C genotype at locus 672 A>C (OR= 0.28, 95% CI =0.10 to 0.76, $P = 0.01$). In this case, haplotype reconstruction and the permutation test did not retrieve any disease-associated haplotype.

One aspect that needs to be stressed is that all the SNPs for which the statistical analysis revealed an association with resistance or susceptibility to tuberculosis were synonymous SNPs. The classical view was that synonymous mutations, also called silent mutations, had no effect on susceptibility to disease as they do not influence the amino acid composition of the encoded protein. However, in the early 1980s, several studies demonstrated that these mutations could also exert an effect on some of the most important processes regulating protein synthesis, and therefore on the phenotype. To date, it is estimated that about 50 human diseases are caused entirely or partly by synonymous mutations, and it has also been demonstrated that they play a role in the resistance to some diseases [23,24]. In the human *TLR2*, for example, synonymous mutations have been identified which are associated with resistance to liver cell carcinoma [14]. A recent meta-analysis carried out in humans identified a significant association between an intron mutation of *TLR9* and tuberculosis [25].

With regard to the mechanisms in which these mutations are involved, a major step forward was the discovery that, in *Escherichia coli*, not all the synonymous codons were used to the same degree. Lipman & Wilbur observed that the choice of certain codons could influence the speed, precision and levels of protein synthesis [26].

Moreover, it has been observed that silent mutations can interfere with various stages of protein “construction”, from DNA transcription to the translation of mRNA into protein.

Silent changes in the codons that form part of the exonic splicing enhancers (ESE) can prevent the introns from being properly eliminated. A notable example of the damage that can be caused by mutations in a splicing enhancer has been documented for the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene [27,28].

Furthermore, even if the introns are correctly eliminated by the primary RNA transcript, the mRNA may not fold in the right way. In the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene, a silent mutation intensifies the folding of the mRNA, which becomes more difficult to unroll, thus reducing synthesis of the protein [29].

Finally, synonymous mutations can alter the stability of the transcript by reducing its affinity for RNA binding proteins. Indeed, in humans, a synonymous mutation of the gene coding for corneodesmosine (*CDSN*) has been associated with the onset of psoriasis in various ethnic groups [30].

Thus, it will be interesting to study these mutations in greater depth, for example by analysing the level of expression of the transcripts and the proteins by means of molecular techniques (e.g., real-time qPCR and Western-blot experiments), to ascertain whether different genotypes induce different levels of expression. Furthermore, mRNA stability assays could shed light on the functional role of the mutations identified [31].

An alternative hypothesis could be that some of the detected synonymous mutations are not directly related to disease susceptibility/resistance, but rather that one or more are linked to other functional mutations on the same chromosome which have not yet been identified. Further studies will be necessary in order to understand how these polymorphisms act.

Conclusions

The work describes novel mutations in bubaline *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes and presents their association with *M. bovis* infection. Studies of the genetic factors involved in complex diseases have not yet provided clear explanations for the onset of such diseases, though they may help to identify their underlying physiopathological pathways. A thorough knowledge of these mechanisms will form the basis of our ability to determine the risk of developing the disease and to understand it in its entirety. This will pave the way to create multiple layers of disease resistance in herds by selective breeding and also to identify and synthesize innovative drugs.

Methods

Study design

The genetic association was studied by means of a case-control approach on 174 water buffaloes from 22 herds in the Campania region. Samples collection was performed within the Italian National plan for the control of tuberculosis, which imposes culling of all the subjects positive to the delayed hypersensitivity test [32] and microbiological processing of the lymphoid tissue for isolation of *M. bovis* [32]. Our analyses, performed during the period 2009-2011, revealed the presence of 54 animals positive to both intradermal TB test and *M. bovis* microbiological isolation. These 54 animals were therefore classified as cases for the case-control study. The choice of the microbiological test to confirm cases identification was considered in order to exclude the possibility of false-positive subjects diagnosed by the delayed hypersensitivity test. The control subjects were collected among the animals which tested negative to repeated intradermal TB tests (at least three tests) during the entire period of the study. The control animals were at least five years-old, and were born and raised in the same herds of cases to ensure an equal level of exposure to infection. The number of controls was estimated taking into account an odds ratio value of 2.0 as a threshold for

significance, with a ratio for cases and controls of 1:2 (power = 80%, confidence = 95%) [11]. Based on these parameters, with an imposed number of cases (54), the required number of controls was 108 for a one-tailed analysis. The present case-control study therefore included 54 cases and 120 controls.

TLRs sequencing

DNA was extracted from blood (control animals) and lymph node (cases) samples using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. PCR primers for amplification of the CDS of the genes *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* were designed using the Web interface Primer3; they are shown in table 3. The *TLR2* coding sequence was amplified using two primer pairs according to the following touchdown PCR protocol: initial step of 7 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 65°C (decreasing by 1°C after each cycle), 1 min 30 s at 72°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C, 1 min 30 s with a final extension of 10 min at 72°C. The *TLR4* CDS was amplified using four primers sets with the following thermal profile: 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at T_{ann} and 45 s at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. T_{ann} is the annealing temperature specifically indicated for each primers pair in Table 3. The *TLR9* CDS was amplified using six primer sets with the following thermal profile: 5 cycles of 30 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 15 s at 72°C followed by 30 additional cycles of 20 s at 95°C, 20 s at T_{ann} , and 30 s at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. All thermal profiles included an initial step at 95°C for 15 min for Taq DNA polymerase activation. The reaction mixture included 5 ng/ \square l of genomic DNA, 0.5 μ M each primer (forward and reverse), 1X HotStar Taq Master Mix (Qiagen) in a final volume of 25 \square l. Amplicons were purified (QiaQuick purification kit, Qiagen), bi-directionally sequenced using the Big Dye Terminator cycle sequencing kit v.1.1 or v.3.1 (Life Technologies) and purified using the DyeEx spin kit (Qiagen). Samples (5 μ l) were denatured with 10 μ l of Hi-Di formamide (Life Technologies) at 95°C for 5 min, and separated by capillary electrophoresis on either ABI PRISM 310 or 3130 sequencers (Life Technologies). Sequencing data were manually inspected by the Sequencing Analysis software v5.4 (Life Technologies).

SNP selection and genotyping

Sequences were analyzed by multiple alignment using BioEdit v.7.1.3 [33] and SeqManII 5.00 software (DNASTAR Inc.). The 174 water buffalo sequences of the *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes were compared with the publicly available sequences GenBank:HM756161 (*Toll-like receptor 2 gene*, complete cds), GenBank:HM469969 (*Toll-like receptor 4 gene*, complete cds), GenBank:HQ242778 (*Toll-like receptor 9 gene*, complete cds), respectively. Each forward and reverse sequence from a single DNA sample was compared with the other in order to generate a consensus sequence and to identify polymorphisms among the samples.

Genetic association analysis

Genotype frequencies were tested for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) by using Fisher Exact test and Chi-square test (χ^2). For each gene the significance of the allele and genotype frequencies distribution between cases and controls was evaluated by the Odds Ratio (OR) calculated with a 95% confidence interval (CI), and *P*-values of the chi-squared test of independence by using Vassarstat software (Richard Lowry, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

Haplotype reconstruction was performed by means of PHASE software, version 2.1 [34].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FA carried out the molecular genetic studies, molecular typing assays, sequence analysis and drafted the manuscript, SP contributed to the molecular analysis and critically revised the manuscript, MGL and GB carried out molecular typing assays, contributed to interpretation of data and manuscript drafting, GU, MT and MGM carried out a part of the molecular analyses and contributed to sequence analysis, AB, PP, PLA and GG conceived the study and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript.

References

1. Coppola S, Parente E, Dumontet S, La Peccerella A: **The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk.** *Le Lait* 1988, **68**:295–310.
2. Adams LG, Templeton JW: **Genetic resistance to bacterial diseases of animals.** *Rev Sci Tech* 1998, **17**:200-219.
3. Bishop SC, MacKenzie KM: **Genetic management strategies for controlling infectious diseases in livestock populations.** *Genet Sel Evol* 2003, **35**(Suppl 1):S3-17.
4. Capparelli R, Alfano F, Amoroso MG, Borriello G, Fenizia D, Bianco A, Roperto S, Roperto F, Iannelli D: **Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*).** *Infect Immun* 2007, **75**:988-996.
5. Trinchieri G, Sher A: **Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:179-190.
6. Akira S, Takeda K, Kaisho T: **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.** *Nat Immunol* 2001, **2**:675-680.
7. Takeuchi O, Akira S: **TOLL-like receptors; their physiological role and signal transduction system.** *Int Immunopharmacol* 2001, **1**:625-635.
8. Takeda K, Akira S: **TLR signaling pathways.** *Semin Immunol* 2004, **16**:3-9.
9. Koets A, Santema W, Mertens H, Oostenrijk D, Keestra M, Overdijk M, Labouriau R, Franken P, Frijters A, Nielen M, Rutten V: **Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.** *Prev Vet Med* 2010, **93**:305-315.
10. Mucha R, Bhide MR, Chakurkar EB, Novak M, Mikula I Sr: **Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle.** *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **128**:381-388.
11. Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, Langaee TY, Rae DO: **Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle.** *Prev Vet Med* 2009, **91**:189-196.
12. Sun L, Song Y, Riaz H, Yang H, Hua G, Guo A, Yang L: **Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle.** *Vet Immunol Immunopathol* 2012, **147**:195-201.
13. Wei T, Gong J, Jamitzky F, Heckl WM, Stark RW, Rössle SC: **Homology modeling of human Toll-like receptors TLR7, 8, and 9 ligand-binding domains.** *Protein Sci* 2009, **18**:1684-1691.
14. Medzhitov R: **Toll-like receptors and innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 2001, **1**:135-145.
15. Amaral ME, Grant JR, Riggs PK, Stafuzza NB, Filho EA, Goldammer T, Weikard R, Brunner RM, Kochan KJ, Greco AJ, Jeong J, Cai Z, Lin G, Prasad A, Kumar S, Saradhi

- GP, Mathew B, Kumar MA, Miziara MN, Mariani P, Caetano AR, Galvão SR, Tantia MS, Vijh RK, Mishra B, Kumar ST, Pelai VA, Santana AM, Fornitano LC, Jones BC, Tonhati H, Moore S, Stothard P, Womack JE: **A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle.** *BMC Genomics* 2008, **9**:631.
16. Mitra M, Taraphder S, Sonawane GS, Verma A: **Nucleotide sequencing and SNP detection of Toll-like receptor-4 gene in Murah Buffalo (*Bubalus bubalis*).** *Int ScholRes Net* 2012, **2012**:7 Art. ID 659513.
 17. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene.** *Science* 1998, **282**:2085-2088.
 18. Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B: **Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria.** *Microbes Infect* 2004, **6**:946-59.
 19. Griebel PJ, Brownlie R, Manuja A, Nichani A, Mookherjee N, Popowych Y, Mutwiri G, Hecker R, Babiuk LA: **Bovine toll-like receptor 9: A comparative analysis of molecular structure, function and expression.** *Vet Immunol Immunopathol* 2005, **108**:11-16.
 20. Acutis PL, Martucci F, D'Angelo A, Peletto S, Colussi S, Maurella C, Porcario C, Iulini B, Mazza M, Dell'Atti L, Zuccon F, Corona C, Martinelli N, Casalone C, Caramelli M, Lombardi G: **Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene.** *Vet Res* 2012, **43**:8.
 21. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J: **PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie.** *J Gen Virol* 1994, **75**:989-995.
 22. Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B: **Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4).** *Genome Biol* 2000, **1**:1.
 23. Chamary JV, Hurst LD: **The price of silent mutations.** *Sci Am* 2009, **300**:46-53.
 24. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM: **The sounds of silence: synonymous mutations affect function.** *Pharmacogenomics* 2007, **8**:527-532.
 25. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NTL, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K: **Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females.** *Tissue Antigens* 2012, **79**:190-197.
 26. Lipman DJ, Wilbur WJ: **Interaction of silent and replacement changes in eukaryotic coding sequences.** *J Mol Evol* 1984, **21**:161-167.
 27. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE: **Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9.** *J Biol Chem* 2003, **278**:26580-26588.
 28. Pagani F, Raponi M, Baralle FE: **Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:6368-6372.
 29. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L: **Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure.** *Science* 2006, **314**:1930-1933.
 30. Capon F, Trembath RC, Barker JN: **An update on the genetics of psoriasis.** *Dermatol Clin* 2004, **22**:339-347.

31. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV: **Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**:205-216.
32. OIE: **Bovine tuberculosis.** In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.*, 2013, Chapter 2.4.7.
33. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium Series* 1999, **41**:95-98.
34. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: **A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.** *Am J Hum Genet* 2001, **68**:978-989.

Table 1 Detected SNPs in bubaline *TLRs*2, 4 and 9 genes

gene	SNPs ^a	AA change ^b	Protein domain
<i>TLR2</i>	42 C>T	/	/
	53 C>T	M18T	/
	108 C>T	/	LRR 8
	153 G>A	/	/
	156 C>T	/	/
	374 T>C	A125V	LRR 8
	381 A>G	/	LRR 8
	482/483 GC>CT	S161T	LRR 8
	519 G>C	/	LRR 8
	1034 A>G	S345N	/
	1375 T>C	/	/
	1407 C>T	/	/
	1650 G>A	/	LRR CT
	1678 A>G	A560T	LRR CT
	1707 C>T	/	LRR CT
	1731 C>T	/	LRR CT
	1740 C>T	/	LRR CT
	2064 T>C	/	/
<i>TLR4</i>	572 A>C ^c	Y191S	/
	572 A>G ^c	/	/
	574 C>T	Q192W	/
	575 A>G	Q192W	/
	576 T>G	/	/
	577 G>A	E193K	/
	579 A>G	/	/
	647 G>A	/	/
	662 G>A	/	/
	672 A>C	/	/
<i>TLR9</i>	2340 C>T	/	/
	2475 A>G	/	/

^a SNPs positions were calculated taking the ATG start codon as position 1 based on the sequences GenBank:HM756161 (*TLR2* gene), GenBank:HM469969 (*TLR4* gene), GenBank:HQ242778 (*TLR9* gene)

^b amino acid positions are given according to the ATG start codon

^c This polymorphic site exhibits a SNP with three different alleles (572 A>CG)

Table 2 Polymorphic sites including genotypes with statistically significant differences in frequency distribution between cases and controls

gene	SNPs	genotype	P-value	OR	CI 95%
<i>TLR2</i>	381 A>G	A/A	0.86	1.13	0.57 - 2.21
		G/G	0.00	52.25	6.75 - 404.57
		A/G	0.00	0.06	0.01 - 0.25
	2064 T>C	T/T	0.00	48.5	10.88 - 216. 26
		C/C	0.00	0.04	0.01 - 0.13
<i>TLR4</i>	672 A>C	T/C	0.47	1.35	0.69 - 2.63
		A/A	0.26	1.55	0.78 - 3.06
		C/C	0.01	0.28	0.10 - 0.76
		A/C	0.43	1.36	0.71- 2.58
<i>TLR9</i>	2340 C>T	C/C	0.04	0.33	0.11 - 0.92
		T/T	0.29	1.43	0.72 - 2.85
		C/T	0.59	1.27	0.64 - 2.47

Bold lines highlight genotypes with statistically significant *P*-values and ORs

Table 3 PCR primers and annealing temperatures for amplification of bubaline *TLRs* 2, 4 and 9 genes

Oligo	Sequence (5' 3')	PCR T _{ann} (°C)
TLR2 A	For: TTTGTAGGTCAAATCACTGGACA Rev: TCCTGGCCACTGACAAGTTT	58 ^a
TLR2 B	For: GCCCTTCCTTCAAACCTTG Rev: CACCACCAGACCAAGACTGA	58 ^a
TLR4 A	For: GTGTGGAGACCTAGATGACTGG Rev: GTACGCTATCCGGAATTGTTCA	60
TLR4 B	For: CTTTCCTGGAGGGACTGTGC Rev: CCACGAAGTTTGAACCTAAGGTAA	60
TLR4 C	For: CTACCAAGCCTTCAGTATCTAG Rev: GGCATGTCCTCCATATCTAAAG	60
TLR4 D	For: AAGGACCAGAGGCAGCTCTT Rev: TAACTGAACACGCCCTGCAT	58
TLR9 A	For: CCAGCCTCTCCTTAATCTCC Rev: CGGAACCAATCTTTCTCTAGTT	54
TLR9 B	For: CCTGACACCTTCAGTCACCT Rev: GCGGGTAAACATCTCTTGCT	55
TLR9 C	For: CGTCAGCTCAAAGGACTTCA Rev: AGGGTGTGCAGATGGTTCTC	56
TLR9 D	For: GGGAGACCTCTATCTCTGCTTT Rev: CGCTCACGTCTAGGATTTTC	56
TLR9 E	For: CTTCAGAAGCTGGACGTGAG Rev: TCTTGCGGCTGCTGTAGAC	55
TLR9 F	For: TGCTCTATGATGCCTTCGTG Rev: AGGTTGGCCCAGAACTACC	55

^a For these primer pairs a touchdown PCR thermal profile was used